



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TALITTA REGINA PARMEZAN

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
PRODUÇÃO DE TERPENOS E GLICEOLINAS EM
RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS EM SOJA**

TALITTA REGINA PARMEZAN

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
PRODUÇÃO DE TERPENOS E GLICEOLINAS EM
RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS EM SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Francismar Correa Marcelino Guimarães.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- T146 Parmezan, Talitta Regina .
Perfil de expressão de genes envolvidos na produção de terpenos e gliceolinas em resposta a estresses bióticos em soja / Talitta Regina Parmezan. - Londrina, 2016.
145 f. : il.
- Orientador: Francismar Correa Marcelino Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.
Inclui bibliografia.
1. Terpenos - Tese. 2. Soja - Tese. 3. Gliceolinas - Tese. I. Correa Marcelino Guimarães, Francismar . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

TALITTA REGINA PARMEZAN

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
PRODUÇÃO DE TERPENOS E GLICEOLINAS EM
RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS EM SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr^a. Francismar Correa
Marcelino Guimarães
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a. Clara Beatriz Hoffmann Campo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Dr. Salvador Lima Brito Junior
GDM Genética do Brasil LTDA

Londrina, 23 de agosto de 2016.

PARMEZAN, Talitta Regina. **Perfil de expressão de genes envolvidos na produção de terpenos e gliceolinas em resposta a estresses bióticos em soja.** 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é uma das principais doenças que acomete a cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.], limitando sua produção e causando perdas de até 80%, o que torna o estresse biótico mais importante da soja cultivada em climas propícios à doença. Estudos recentes demonstraram que muitos derivados voláteis oriundos das interações de plantas e pragas e na sinalização de planta-patógeno, regulam etapas do desenvolvimento do fungo. Especialmente no patossistema soja-*P.pachyrhizi*, foi demonstrado que o acetato de farnesil suprimiu o desenvolvimento de fungos. Adicionalmente, os níveis do composto (E,E) α -farneseno foram reduzidos em ambos os genótipos de soja resistentes (PI230970) e susceptíveis (Embrapa 48) após a infecção com a ferrugem da soja. Neste sentido, neste trabalho investigou-se o impacto direto da infecção por *P. pachyrhizi* no perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de terpenóides, bem como nos níveis de gliceolina via UPLC, além do efeito direto destes dois compostos em folhas de soja. As análises foram realizadas em genótipos de soja contendo diferentes genes de resistência a *P.pachyrhizi* (Rpp2, 4 e 5) após infecção patogênica, e ao longo de todo o ciclo de infecção (12, 24, 48, 72, 96 e 192 após a inoculação). Observou-se que o perfil de expressão dos genes estudados é dependente de genótipo e que o desenvolvimento do fungo sofre interferência dos compostos analisados no presente estudo. Através dos dados obtidos foi possível ratificar a importância da gliceolina nas respostas de defesas basais da soja, sendo estas informações relevantes para um melhor entendimento das vias metabólicas envolvidas nos processos de defesa atuantes nesta interação.

PARMEZAN, Talitta Regina. **Expression profile of genes involved in terpenes and glyceolines production in response biotic stresses in soybean.** 2016. 137 p. Dissertation (Master degree in Biotechnology) - Londrina State University, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Asian soybean rust (FAS) caused by obligatory biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., is main diseases affecting soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], limiting its production and causing losses of up to 80%, which makes biotic stress more important than cultivated soybean in disease-prone climates. Recent studies have shown that many volatile derivatives from plant and pest interactions and plant-pathogen signaling regulate stages development fungal. Especially in soybean-*P.pachyrhizi* pathosystem, it has been shown that farnesyl acetate suppressed fungal development. Additionally, levels (E, E) α -farnesene compound were reduced in both soybean genotypes resistant (PI230970) and susceptible (Embrapa 48) after soybean rust infection. In this sense, this work investigated direct impact of *P. pachyrhizi* infection on expression profile genes involved in terpenoid biosynthesis, as well as on UPLC glycoline levels, in addition to direct effect these two compounds on soybean leaves. The analyzes were performed on soybean genotypes containing different *P.pachyrhizi* resistance genes (Rpp2, 4 and 5) after pathogenic infection, and throughout the infection cycle (12, 24, 48, 72, 96 and 192 after inoculation). It was observed that expression profile studied genes is genotype dependent and that development fungus suffers interference from compounds analyzed in present study. Through the obtained data was possible to ratify glyceoline importance in responses of soybean basal defenses, being this information relevant for a better understanding of metabolic pathways involved in defense processes acting in this interaction.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

COV's	Compostos orgânicos voláteis
Dai	Dias após a infecção
Sai	segundos após a infecção
DMAPP	dimetilalil difosfato
ESTs	Expression Sequence Tag
FAS	Ferrugem asiática da soja
FPP	farnesio difosfato
G4DT	(-)-glicinol 4-dimetilaliltransferase
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GPP	geranil difosfato
Hai	Horas após a infecção
HIPVs	herbivore induced volatile
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase
HW94-1	Hawai 94-1
IPP	Isopentenil difosfato
MEP	metileritritol fosfato
MVA	mevalonato
RE	Retículo endoplasmático
SLMs	(<i>Small lipophilic molecules</i>) moléculas lipofílicas
TA	Temperatura ambiente
TW72-1	Taiwan 72-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1	A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA	10
2.1.1	Agente Causal	10
2.1.2	Ciclo de Vida e Sintomatologia	11
2.1.3	Medidas de Controle	9
2.2	COMPOSTOS ORGANICOS VOLÁTEIS (COVs)	10
2.2.1	Definição e Funções Biológicas	10
2.2.2	Terpenoides	14
2.2.3	COV's na Resposta a Estresses	16
2.2.4	Gliceolinas	19
2.3	RESPOSTAS MOLECULARES DE DEFESA MEDIADAS POR GENES DE RESISTÊNCIA	23
3	OBJETIVOS GERAIS	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	JUSTIFICATIVA	34
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	MATERIAL BIOLÓGICO	35
5.2	INOCULAÇÃO DE P. PACHYRHIZI	35
5.3	COLETA DO MATERIAL E EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	36
5.4	SÍNTESE DO cDNA	37
5.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NA BIOSSÍNTESE DE COV POR RT-qPCR	38
5.6	ANÁLISE IN SILICO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE COV	42
5.7	EFEITO DA AÇÃO DIRETA DO COV (E,E) α - FARNESENO NA INFECÇÃO DE FERRUGEM EM SOJA	45
5.7	DETERMINAÇÃO DE GLICEOLINA	46

5.7.1	Amostra:	46
5.7.2	Preparo das Amostras:	46
5.7.3	Separação e Identificação do Analito:	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1	PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE SESQUITERPENOIDES VOLÁTEIS APÓS INFECÇÃO COM P. PACHYRHIZI – ANÁLISES IN VIVO	48
6.1.1	Perfil Transcricional de Genes Envolvidos na Produção de IPP/DMAPP Pela Via do Mevalonato Após a Infecção por P. pachyrhizi	52
6.1.2	Perfil Transcricional de Genes Codificando Prenilases Envolvidas na Produção de Terpenoides e Gliceolina Após a Infecção por P. pachyrhizi	56
6.1.3	Perfil Transcricional da Terpeno Sintase Envolvida na Síntese de (E,E) α -Farneseno Após a Infecção por P. pachyrhizi.....	61
6.2	PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES DA ROTA MVA EM RESPOSTA ESTRESSE BIÓTICOS EM SOJA – ANÁLISE IN SÍLICO.....	64
6.3	EFEITO DIRETO DO COMPOSTO ACETATO DE FARNESIO E DO COV (E, E) α -FARNESENO EM FOLHAS DE SOJA INFECTADA POR P. PACHYRHIZI	66
6.4	DETERMINAÇÃO DE GLICEOLINA EM FOLHAS DE SOJA INFECTADAS POR P. PACHYRHIZI	68
7	CONCLUSÕES	72
	ANEXOS	73
8	REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja (FAS) é uma doença causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P.Syd). Os prejuízos causados pela ferrugem no Brasil variam de 10% a 90% (SINCLAIR; HARTMAN, 1999; YORINORI *et al.*, 2005), sendo que os danos causados dependem do estágio de desenvolvimento da planta e do grau de severidade do ataque do patógeno, podendo necrosar as partes jovens da planta, matar plantas jovens e prejudicar a produção de grãos nas plantas adultas (BEDENDO 1995).

Na tentativa de reduzir os danos causados pela FAS, diferentes alternativas de controle vem sendo empregadas, como o desenvolvimento de variedades de soja resistentes, o uso de fungicidas específicos ou de amplo espectro, bem como a adoção de períodos de vazio sanitário. Apesar do uso de fungicidas ser uma medida eficiente para o controle da doença, seu uso onera a produção e causa impactos ambientais, como a contaminação de solos e lençóis freáticos, além de favorecer a seleção de variantes resistentes do patógeno. Por outro lado, o desenvolvimento de cultivares de soja com resistência ampla e duradoura contra *P. pachyrhizi* ainda não foi descrita.

Estudos vem sendo desenvolvidos tendo como foco a identificação dos mecanismos de resposta a infecção em genótipos contendo diferentes genes de resistência a *P. pachyrhizi* (genes Rpp), via estudos de transcriptômica e genômica funcional, visando a identificação de genes, rotas metabólicas e compostos que estejam envolvidos nos mecanismos de defesa (CHOI *et al.* 2008; VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011; TREMBLAY *et al.* 2011; PANDEY *et al.* 2011; BRITO JÚNIOR 2013; MORALES *et al.* 2013).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) constituem umas das principais moléculas sinalizadoras em plantas, comumente produzidos em decorrência da infecção por bactérias (HUANG *et al.*, 2012), fungos (MENDGEN *et al.*, 2006) e insetos (PICKETT *et al.*, 2012; TAMIRU *et al.*, 2012), podendo ter efeito negativo no processo infeccioso. Tais compostos

agem como sinalizadores, estimulando os mecanismos de defesa da planta, incluindo suas partes sistêmicas intactas, ou até mesmo o reconhecimento por plantas vizinhas (BALDWIN *et al.*, 2006; HEIL & SILVA BUENO, 2007).

Estudos recentes da interação soja-*P.pachyrhizi* permitiram a identificação de COVs produzidos pela soja quando submetida à infecção do fungo *P. pachyrhizi*. Após a inoculação do patógeno em plantas de soja suscetível (Embrapa 48) e resistente (PI 230970) à ferrugem, Brito Júnior e colaboradores (2013), identificaram o volátil (E,E) α - farneseno, que teve sua produção reduzida nas horas iniciais após a infecção, em ambos os genótipos. Tal redução foi inversamente proporcional ao nível de sintomas da planta, isto é, quanto mais evidente o sucesso da infecção menor foi a produção do COV. Sabe-se que esse sesquiterpenóide é produzido a partir de precursores isopentil difosfato oriundos das rotas metabólicas citoplasmática e plastídica, mevalonato e metileritritol, respectivamente (DUDAREVA *et al.* 2005; BRITO JÚNIOR 2013). Várias enzimas que participam desta via metabólica foram identificadas como diferencialmente reguladas em trabalhos prévios de prospecção de genes de soja em resposta ao ataque de *P. pachyrhizi*, em plantas de soja com diferentes backgrounds quanto ao genes de resistência (CHOI *et al.* 2008; TREMBLAY *et al.* 2011; VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011;).

Neste sentido, o principal objetivo desta proposta foi estudar o envolvimento do COV (E,E) α - farneseno nos mecanismos de defesa da soja em resposta à infecção com o fungo *P. pachyrhizi*. Neste contexto, genes associados à produção deste volátil foram avaliados quanto ao perfil de expressão em genótipos de soja contendo os genes Rpp2, 4 e 5 após a infecção pelo patógeno, bem como, em bancos de dados Transcriptômicos de soja, a fim de, confirmar a relação funcional desses compostos com o mecanismos de defesa expressos no patossistema Soja- *P. pachyrhizi*. Ainda, o efeito direto (E,E) α - farneseno no nível de desenvolvimento da doença, e a potencial interconexão da rota do mevalonato com a produção direta de gliceolinas, fitoalexinas associadas aos mecanismos de defesa da soja, foram avaliados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Ferrugem Asiática da Soja

2.1.1 Agente causal

Os fungos denominados de basidiomicetos (Filo *Basidiomycota*) são da ordem *Uredinales*, alguns deles são parasitas obrigatórios. Os agentes causais da ferrugem são representantes deste filo, com mais de 6000 espécies distribuídas em mais de 120 gêneros. Dentre estes, destacam-se alguns que tem maiores frequências em plantas hospedeiras economicamente importantes, tais como: *Puccinia*, *Hemileia*, *Uromyces*, *Phakopsora*, *Phragmidium*, *Cronartium* e *Melampsora* (BEDENDO 1993). Estes fungos são caracterizados pela produção de vários tipos de estruturas reprodutivas, as quais são partes constituintes das lesões provocadas nos hospedeiro e, também estruturas de frutificação que correspondem as diferentes fases de seu ciclo.

A ferrugem asiática da soja (FAS) foi detectada no Brasil somente em maio de 2001 (YORINORI 2002), e, atualmente, tem sido considerada um dos principais fatores limitantes da sojicultura. O patógeno pertence à família *Phakopsoraceae* e ao gênero *Phakopsora* e infecta pelo menos 41 espécies em 17 gêneros de leguminosas. Essa extensa série de hospedeiros pode contribuir para um copioso e complexo padrão de virulência apresentado pelo patógeno (HARTMAN *et al.*, 2005).

Os agentes causais da ferrugem são obrigatoriamente parasitas biotróficos, pois, necessitam de um hospedeiro vivo para que possam se desenvolver. Após a colheita, esses se instalam em plantas voluntárias na forma de uredósporos (esporos produzidos pelo urédio na fase I de seu desenvolvimento) ou diante de situações desfavoráveis os teliósporos é quem atuam como forma de resistência garantindo a sobrevivência do patógeno (BEDENDO 1993).

2.1.2 Ciclo de Vida e Sintomatologia

O fungo *P. pachyrhizi* é capaz de colonizar hospedeiros específicos em uma associação compatível ou incompatível. Todos os nutrientes necessários para o crescimento do patógeno são obtidos através do parasitismo de células vivas do hospedeiro. Os esporos de *P. pachyrhizi* são dispersos pelo vento atingindo até centenas de quilômetros e, ao atingirem uma planta suscetível, os uredósporos, predominantemente, dão início ao processo da colonização (SINCLAIR & BACKMAN 1989). Entretanto, a colonização só ocorre efetivamente quando a temperatura está amena, entre 18 e 26,5 °C (TECNOLOGIAS 2014) e há saturação da umidade do ar. Se houver uma lâmina de água na superfície foliar este processo é favorecido, pois a água é fundamental nos processos monocíclicos de germinação e infecção.

O processo de infecção se inicia com a germinação do esporo cerca de 1 a 2 horas após a infecção - hai, formando o tubo germinativo que cresce através da superfície foliar adaxial resultando na formação de uma estrutura infectiva denominada apressório etapa que ocorre entre 7-12 hai. O apressório exerce forte pressão sobre a parede da epiderme promovendo a invasão direta da hifa de penetração do fungo (BEDENDO 1993), processo que ocorre entre 15-20 hai. A hifa de penetração passa através da cutícula e cresce nos espaços intercelulares do mesofilo. Finalmente, o patógeno alcança o espaço intracelular (entre 24- 48 hai) do hospedeiro através da formação do haustório, uma estrutura de alimentação especializada dos fungos biotróficos. Através desta estrutura tais patógenos secretam proteínas efetoras no interior da célula hospedeira com a função de manipular o metabolismo celular, redirecionar ou reprogramar a série de fluxo metabólico, sabotar as respostas imunes e facilitar a colonização do hospedeiro (PANSTRUGA 2009), possibilitando o desenvolvimento de novas hifas e o estabelecimento de outros sítios de alimentação (TREMBLAY 2009). As etapas de infecção estão ilustradas nas Figuras 1e 2.

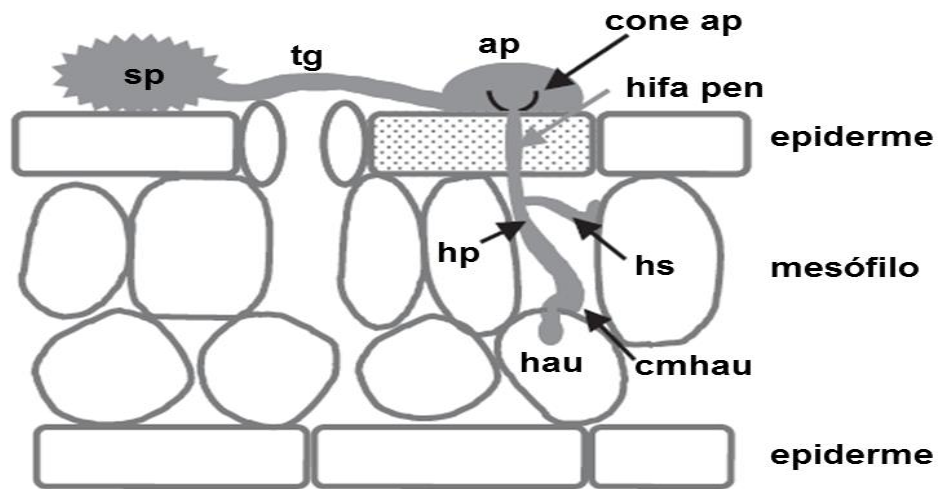


Figura 1 – Estágios de desenvolvimento durante interação *P. pachyrhizi* e planta hospedeira. Os uredósporos (sp) germinam dando origem ao tubo germinativo (tg) que desenvolve um apressório (ap). No seu interior ocorre a formação do cone apressorial (cone ap) seguido pelo desenvolvimento da hifa de penetração (hifa pen). A hifa de penetração alcança o espaço intercelular dando origem a hifa primária (hp) a qual se ramifica em hifas secundárias (hs). Finalmente a célula mãe do haustório (cmhau) é a forma a partir da qual o patógeno invade a célula do mesófilo formando o primeiro haustório (hau) estabelecendo a interação com o hospedeiro. Adaptado de Goellner *et al.* (2010).

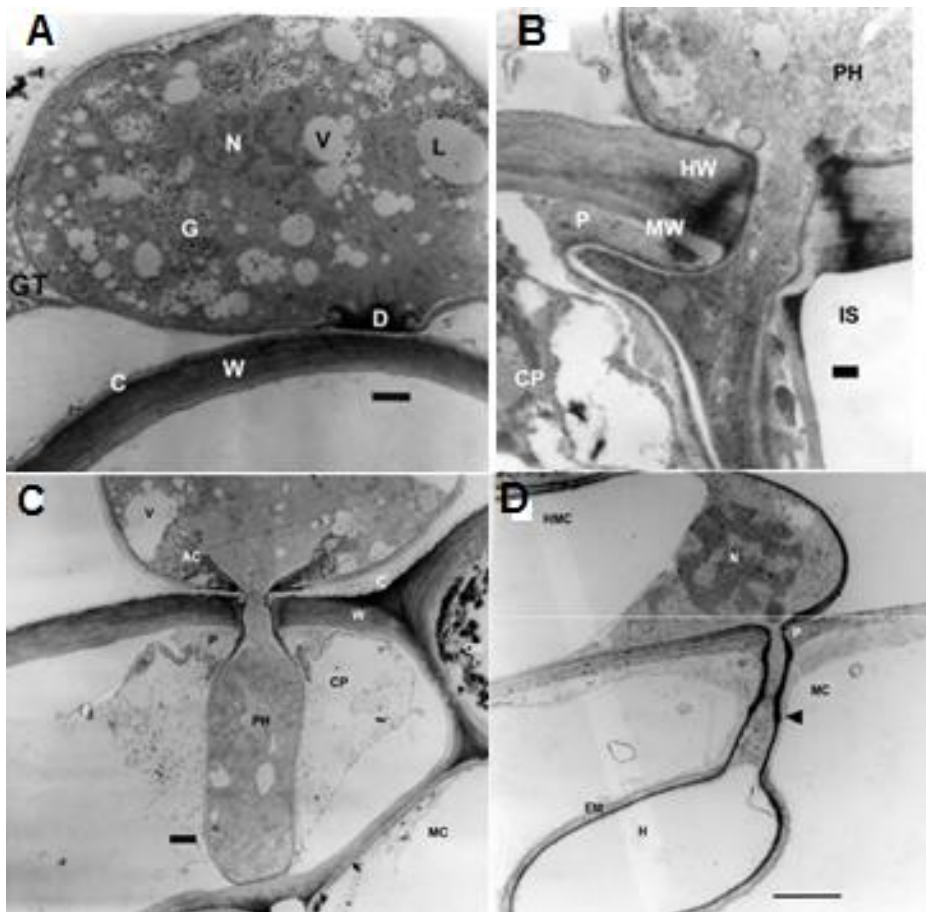


Figura 2- Adaptado. Análise microscópica estágios de desenvolvimento durante interação *P. pachyrhizi* e planta hospedeira. A) Pré-penetração do apressório em folhas de soja. Durante o desenvolvimento precoce do apressório. A formação de materiais de coloração escura (D) na parede inferior apressorial na área onde irá formar a hifa penetração. (Legenda: C = cutícula do hospedeiro, D = material de coloração escura, G = grânulos, GT = tubo germinativo, L = lipídeos, N = núcleo, V = vacúolo, W = parede hospedeiro). Hifa de penetração passando através da parede inferior de células epidérmicas de soja e da parede celular do mesófilo adjacente. Nota falta de linhas de tensão em ambas as paredes das células, o que indica a penetração através de digestão. Bars = 0,5 μ m. (Legenda: CP = citoplasma, HW= células epidérmicas inferior da parede, IS = espaço intercelular, P = papila, PH = hifa de penetração). C) Penetração em folha de soja. Deflexão por pressão na cutícula, e a falta de linhas de tensão na parede da epiderme, indicando digestão. (Legenda: AC = cone apressorial, C = cutícula, CP = citoplasma, PH = hifa de penetração, V = vacúolo, W = parede do hospedeiro). D) Formação haustorial. (Legenda: EM = membrana extrahaustorial, H = haustório, HMC = célula mãe haustorial, MC = célula do mesófilo, N = núcleo, P = papila) (EDWARDS e BONDE, 2011).

O desenvolvimento do haustório caracteriza o biotrofismo. A estrutura está separada do citoplasma hospedeiro pela membrana plasmática da planta, pela matrix extra haustorial e pela membrana plasmática do haustório. De modo que representa o ponto de contato mais íntimo entre o patógeno e a planta hospedeira, tendo papel fundamental nesta interação.

Após o estabelecimento da relação biotrófica, os fungos se reproduzem formando uma massa pulverulenta que força a epiderme da planta ao ponto de rompê-la deixando expostos os uredósporos para novas infecções (BEDENDO 1993), permitindo a observação da presença de lesões na superfície abaxial das folhas, denominadas uredinias (Figura 3). Com a formação das uredinias, a esporulação é iniciada entre sete e nove dias após a infecção, resultando na formação de novas uredinias secundárias (Figura 4)

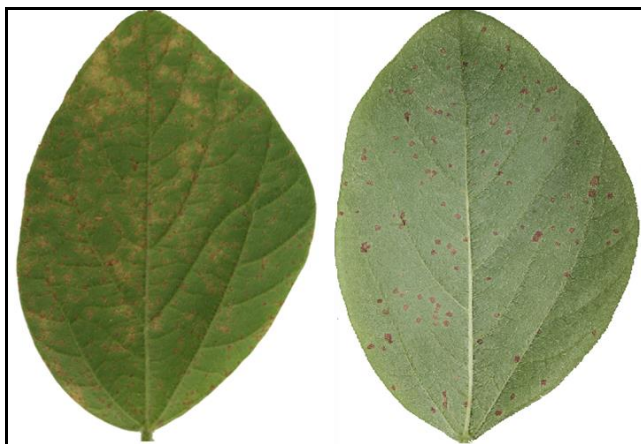


Figura 3 - Sintomas na face abaxial de folhas de soja infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi*. A esquerda lesões castanho-clara (TAN) e castanho-avermelhada (lesões RB) a direita. Foto: Luana Mieko Darben, 2013.



Figura 4 – Uredias com poros abertos (esquerda) e uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (direita) Fotos: Rafael A. Vieira, 2005.

As lesões causadas por esse tipo de patógeno acarretam interferências no metabolismo das folhas, como a perda de água e a

diminuição da habilidade fotossintética. De acordo com Bonde (2006), as mesmas podem ser classificadas de duas formas, castanho clara (TAN), com muitos soros urediniais e abundante esporulação ou castanho avermelhada, com poucos soros urediniais e com pouca ou nenhuma esporulação (RB). As lesões do tipo RB são características da resistência vertical ou qualitativa no hospedeiro, é típica de materiais com genes dominantes de resistência, podendo ser descrita como uma reação de hipersensibilidade do hospedeiro. As células que estão próximas ao local de infecção morrem limitando o crescimento do patógeno (CAMARGO 1995).

A severidade da infecção é dependente de fatores como: ambiente (temperatura, radiação e molhamento foliar), idade dos uredóporos do patógeno, e também está sujeita ao estágio de desenvolvimento do hospedeiro (ALVES *et al.*, 2006). Sendo assim, quanto antes ocorrer a desfolha, menor será o grão, menor será o rendimento e a qualidade do mesmo. Em casos severos, quando a soja é infectada na fase de formação das vagens ou no início da granação pode ocorrer o aborto ou a queda das vagens, podendo ocasionar a perda total de produtividade. Há relatos de que a radiação também pode interferir de maneira negativa na germinação dos esporos do fungo de FAS. Portanto, quanto maior for o tempo de exposição à radiação solar menor é a taxa de germinação dos uredóporos (NICOLINI *et al.* 2010).

2.1.3 Medidas de Controle

Atualmente a FAS é detectada em todas as regiões produtoras de soja no Brasil, que possui condições climáticas propícias ao desenvolvimento do fungo. A fim de reduzir os danos causados pela ferrugem estratégias de controle vem sendo empregadas, como a adoção do vazio sanitário e o uso do controle químico e genético.

O vazio sanitário é uma medida preventiva que corresponde ao período entressafra que não há soja viva no campo, em um período mínimo de 60 dias, podendo chegar a 90 dias, de acordo com cada região e clima, visto que o tempo máximo de viabilidade do fungo em plantas vivas é 55 dias. O

vazio sanitário visa diminuir a quantidade de inóculo da ferrugem (uredosporos – esporos que aparecem na fase epidêmica da doença), e, conseqüentemente, retardar a incidência da doença na safra verão (TECNOLOGIA 2014).

O uso de fungicidas, de amplo espectro ou específicos, ainda é considerada uma medida eficiente para o controle da FAS, amenizando as perdas na produtividade, e, embora onere a produção, ainda é economicamente viável para o sojicultor (TECNOLOGIA 2014). No entanto, sua aplicação causa diversos impactos ambientais, tais como a contaminação de solos e lençóis freáticos, bem como exerce uma forte pressão seletiva de variantes resistentes do patógeno se utilizado indiscriminadamente.

Além das medidas de controle acima mencionados, o controle genético tem sido explorado no desenvolvimento de cultivares resistentes. Até o momento, seis genes (genes R) dominantes que conferem à soja resistência à ferrugem asiática, foram identificados: Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4, Rpp5 e Rpp6 (BROMFIELD e HARTWIG, 1980; MCLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG e BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012), e mapeados geneticamente no genoma da soja (HYTEN *et al.*, 2007, MONTEROS *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CHAKRABORTY *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012).

Contudo, esses genes R dominantes são considerados raça-específicos e conferem resistência a um conjunto limitado de isolados do fungo (LI, 2009; YAMANAKA *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas em 2002 pela Embrapa Soja chegaram a testar onze cultivares de sojas consideradas resistentes ou moderadamente resistentes à ferrugem, todas, entretanto, tiveram sua resistência rapidamente quebrada por um isolado do fungo proveniente do Mato Grosso na safra de 2003 (YORINORI 2004).

2.2 Compostos orgânicos voláteis (COVs)

2.2.1 Definição e funções biológicas

Compostos orgânicos voláteis (COV's) são pequenas moléculas lipofílicas, variando entre cinco e vinte átomos de carbono, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, sendo facilmente vaporizadas às condições de temperatura e pressão ambientes. A composição dos COVs pode ser variável (quantitativa e qualitativamente) em função de fatores bióticos ou abióticos (D'ALESSANDRO e TURLINGS, 2005). Suas propriedades físicas lhes permitem atravessar livremente as membranas celulares para que sejam emitidas ao ambiente (DUDAVERA *et al*, 2013).

Durante o seu crescimento e desenvolvimento, as plantas sintetizam cerca de 100.000 produtos químicos, e, até o momento, foi identificado que 1.700 destes, são compostos voláteis (KASK *et al.*, 2013). Além disso, sabe-se que a maioria das plantas alteram suas taxas de produção e emissão desses COV's quando submetidas a danos físicos, químicos, ou ataques patogênicos. Esta emissão é caracterizada por indução sistêmica da resistência fornecendo maior proteção ao hospedeiro. Considerando que a composição dos COV's emitidos pela planta está diretamente relacionada aos danos (abióticos e bióticos) sofridos por ela (MAFFEI, 2010), geralmente tais compostos tem natureza orgânica com elevada pressão de vapor. Os COVs são facilmente vaporizados às condições de temperatura e pressão ambientes, apresentando valores da constante da Lei de Henry superiores a $10^{-5} \text{ atm.m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (ou $\text{KH} > 4,1 \cdot 10^{-4}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) e com pesos moleculares inferiores a 200 g.mol^{-1} (CHIARANDA, 2006; SCHIRMER, 2004; GABAI, 2000; LE CLOIREC, 1998).

Há seis vias responsáveis pela produção de COVs pela planta, sendo que todos isoprenoides são produzidos a partir de precursores de dimetil difosfato (DMAPP) e de seu isômero isopentenil difosfato (IPP), os quais são sintetizados pelas vias do mevalonato (MVA) e metileritritol fosfato (MEP). Assim, ambas as vias dependem da ação da enzima isopentenil difosfato isomerase (IDI), que converte reversivelmente IPP em DMAPP, controlando o equilíbrio entre elas (DUDAREVA, 2013). O que determina a formação desses compostos é a quantidade de precursores disponibilizados pelo metabolismo primário do hospedeiro, que é comum a todas as seis vias ilustrado pelo tronco da árvore da figura 5.

Com base em sua origem biossintética, os compostos orgânicos voláteis são divididos em diferentes classes. As principais incluem fenilpropanoides/benzenoides, derivados de aminoácidos e de ácidos graxos, e os terpenoides, derivados de isoprenos, do ácido mevalônico, proveniente da união de unidades de acetil-CoA (representado pela letra B na figura 5), e também do metileritritol fosfato, oriundos de unidades de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (representado pela letra A na figura 5) (DUDAREVA *et al.*, 2013). A partir de precursores (originados dos metabólitos primários) é possível formar benzenóides/ fenilpropanóides por meio da via do chiquimato, diferentes tipos de terpenóides (monoterpenos, diterpenos, hemiterpenos), bem como isoprenos e derivados de carotenoides voláteis. Estes dois últimos provenientes da via MEP, e, por fim o metil jasmonato/Voláteis de folhas verde como são conhecidos os compostos provenientes da via lipoxigenase (LOX), conforme mostra a figura 5.

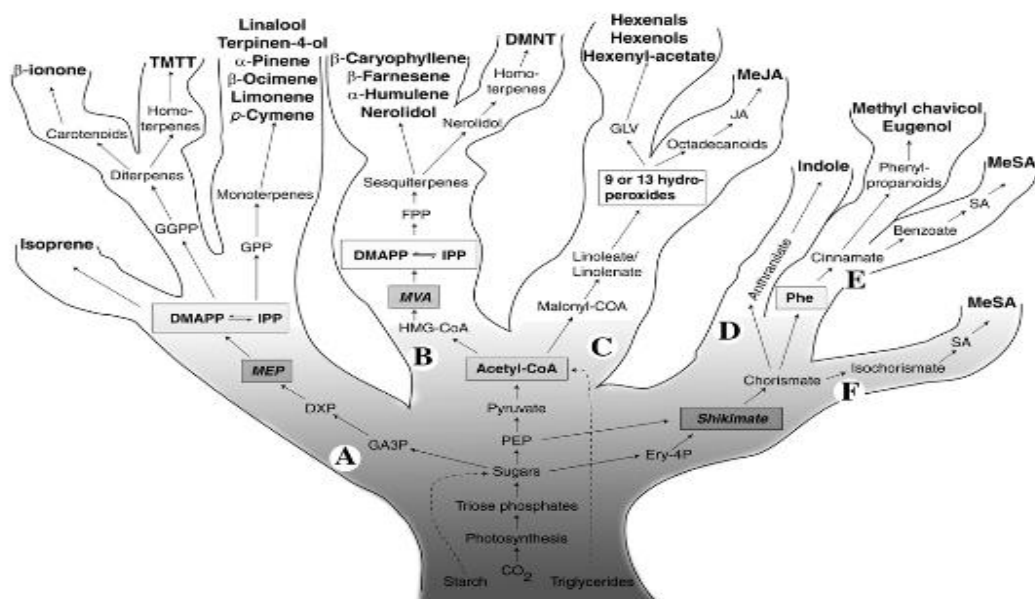


Figura 5. Adaptado. Visão geral das vias biossintéticas que levam à emissão de compostos orgânicos voláteis (COV) pelas plantas. Precursores de compostos orgânicos voláteis de plantas são originários de metabolismo primário (representado no caule da árvore). Nos troncos da árvores está ilustrado o envolvimento de várias reações enzimáticas. (A) vias do metileritritol fosfato (MEP) que formarão os monoterpenos, diterpenos e isoprenos. (B) vias do ácido mevalônico (MVA) que sintetizarão os sesquiterpenos. (C) vias lipoxigenase (LOX) que levam a emissão de metil jasmonato (JÁ)/verde voláteis de folhas (GLV). (D) vias do chiquimato/fenilalanina que formarão os compostos benzenóides/fenilpropanóides (nas extremidades dos galhos estão representados todos os respectivos COV's formados em cada via metabólica). (E) COV's aromáticos como eugenol derivam fenilpropanoides, enquanto MeSA derivada da via ácido salicílico (SA) gerado a partir do ácido benzoico. (F) MeSA pode ser formado pela metilação de SA decorrente isochorismato. (MAFFEI, 2010)

De modo geral, a produção dos COV's de defesa consiste de três etapas: vigilância, transdução de sinal, e a produção de compostos orgânicos

voláteis propriamente ditos (CHEN, 2008). O sistema de vigilância da planta detecta ataques de parasitas através do reconhecimento específico de sinais, que são transportados através de vias de transdução de sinal, os quais eventualmente levam à produção dos quimivoláteis de defesa. Muitos COV's, em particular a maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos, são sintetizados e depositados em tecidos secretores. Estes tecidos são geralmente classificados de acordo com as substâncias envolvidas na produção dos COV's a exemplo: os tricomas glandulares (presentes geralmente em *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Geraniaceae*, *Solanaceae* e *Cannabaceae*), os dutos de resinas (presentes em famílias *Myrtaceae*, *Asteraceae*, *Umbelliferae* e *Leguminosae*) e as cavidades (presentes nas famílias *Rutaceae*, *Clusiaceae*, *Myrtaceae*) (MAFFEI, 2010).

Sabe-se que alguns químicos voláteis de defesa em concentrações elevadas podem ser tóxicos para a planta em si, desta forma, a planta armazena os COV's com precursores inativos, por exemplo, como glicosídeos (JERKOVIC E MASTELIC, 2001), ou em compartimentos extracelulares, como no caso de tricomas. Tais compostos são liberados a partir de folhas, flores e frutos para a atmosfera e de raízes para o solo (MAFFEI, 2010). Os COVs agem como sinalizadores estimulando os mecanismos de defesa da planta, incluindo suas partes sistêmicas intactas, ou até mesmo o reconhecimento por plantas vizinhas (BALDWIN *et. al*, 2006). Executam ainda, o papel de indutores de resistência, conduzindo a uma capacidade ampliada de estimular respostas de defesa infecto-induzidas na interação planta-patógeno (HEIL & SILVA BUENO, 2007). Estes COV's são denominados de metabolitos secundários e atuam no impedimento de alimentação pelo patógeno, na produção de compostos alelopáticos, que interferem no desenvolvimento de sistemas biológicos e na produção de agentes antimicrobianos (LAUREN & PETER, 2011).

As folhas, normalmente liberam, pequenas quantidades destes voláteis, mas quando a planta sofre algum tipo de estresse biótico ou abiótico, esse padrão pode ser alterado (LAW & REGNIER, 1971). Isto ocorre porque, a ativação e liberação desses COV's são ocasionadas pela perturbação do

vacúolo (onde ficam armazenadas), seguida de hidrólise enzimática, que ocorre durante algum tipo de dano tecidual causado pelo patógeno (LAUREN & PETER, 2011).

2.2.2 Terpenoides

Os terpenos representam uma classe de compostos orgânicos voláteis, formados a partir da combinação de duas ou mais unidades de isoprenos de fórmula molecular $(C_5H_8)_n$. Há duas rotas independentes responsáveis pela produção destes compostos que estão em compartimentos separados: a MEP, que fornecem precursores para a formação dos hemiterpenos voláteis, dentre eles os monoterpenos, diterpenos e os isoprenos, que são precursores de uma variedade de fitoalexinas, a exemplo a gliceolina; e a via do MVA, que é responsável pela produção de precursores dos sesquiterpenos, que apresentam C_{15} e compreendem β -bisaboleno, (-)-zingibereno, α -cariofileno, β -farneseno, bem como o α -farneseno. Este último, é catalisado pela ação da enzima farneseno sintase, que converte (2E, 6E)-farnesil difosfato neste volátil. Sabe-se que este último composto pode estar relacionado com os mecanismos de defesa da soja quando infectada pela FAS (BRITO JÚNIOR et al, 2013).

Os terpenóides sesquiterpenos formados pela via MVA desempenham papel primordial na manutenção da fluidez da membrana celular, como pigmentos ou fito-hormônios e ainda como metabólitos especializados através de moléculas de sinalização que estão envolvidos com a resistência de plantas em diferentes interações (ARENDRT *et al.*, 2016). Eles integram a maior e mais diversificada classe de metabólitos secundários, derivados de dois precursores comuns de cinco carbonos isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero difosfato dimetilalil (DMAPP).

As vias do mevalonato e metileriltritol fosfato apesar de formarem os mesmos precursores dos terpenos (figura 6), possuem algumas diferenças relevantes: a MEP está localizada nos cloroplastos, que atuam na integração

de múltiplos estímulos ambientais, e pode ser alimentada pelo piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (GAP), oriundos do ciclo de Calvin, e sintetiza simultaneamente DMAPP e IPP. Em contrapartida, a via do MVA está localizada no citosol, peroxissoma e no retículo endoplasmático (RE), inicia-se com acetil-CoA e termina com a formação de isopentenil pirofosfato (IPP), que é convertido em seu isômero DMAPP por uma IPP isomerase (IDI). Um intermediário importante na via do MVA é o ácido mevalônico, gerado a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA) pelo inibidor da HMG-CoA redutase localizada no RE (HMGR). Esta HMGR é considerada a enzima central de toda a via do MVA. Para a formação de sesquiterpenos (C₁₅) ocorrem duas condensações sucessivas de IPP com DMAPP ou através da condensação de IPP com o GPP pela ação da Farnesil difosfato-sintase (FPP) que forma o precursor farnesil difosfato (FPP), o qual é gerado no citosol das células da planta. O próximo passo é a conversão deste precursor prenil difosfato em um esqueleto carbônico, pela ação das terpeno-sintases (TPSs), que eliminam o grupamento difosfato. O que determina os arranjos formados por esta cadeia carbônica em diferentes sesquiterpenos são as TPS, que são codificados pela variedade de genes contidos no genoma da planta (ARENDET *et al.*, 2016).

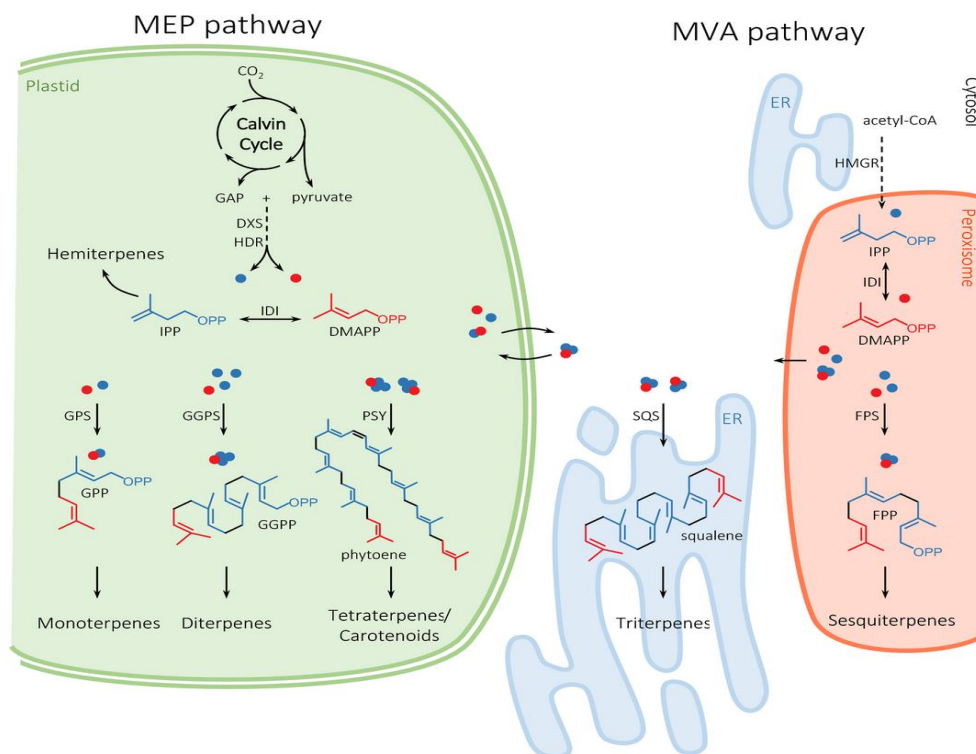


Figura 6. Adaptado. Biossíntese de terpenos em plantas através das vias MVA e MEP. Tanto o plastidial metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) e via citosólica/ER/peroxissomo via ácido mevalônico (MVA) geram o C_5 precursores isopentenila difosfato (IPP, azul) e dimetilalil difosfato (DMAPP, vermelho). Enquanto que a plastidial 4-hidroxi-3-metilbut-2-enildifosfato redutase (HDR) gera ambos os difosfatos monoprenil, a via do MVA conduz à formação de apenas IPP, que é isomerizada para DMAPP por IPP isomerase (IDI). Enzimas-chave nos percursos individuais estão mencionadas, setas tracejadas indicam várias reações enzimáticas. Para simplificar as estruturas químicas, os fosfatos são representados por "P".
 Legenda: DXS: 1-desoxi-D-xilulose sintase 5-fosfato; ER: retículo endoplasmático; FPP: difosfato de farnesil; FPS: FPP-sintase; GAP: gliceraldeído-3-fosfato; GGPP: geranyl difosfato de geranyl; GPP: difosfato de geranyl; GPS: GPP-sintase; HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase; PSY: fitoeno sintase; SQS: esqualeno sintase. (ARENDR *et al.*, 2016)

2.2.3 COV's na resposta a estresses

Os COVs são disponibilizados naturalmente em pequenas quantidades pelas plantas, entretanto, a quantidade liberada pode sofrer alterações provenientes de algum tipo de estresse abiótico ou biótico (LAW & REGNIER, 1971).

De modo geral, os estresses abióticos que podem afetar a produção de COV's referem-se às temperaturas muito baixas ou muito altas, ausência ou o excesso de umidade no solo, luz, escassez de oxigênio, presença de poluentes atmosféricos, intoxicação por minerais, acidez ou alcalinidade do solo (AGRIOS 2005).

Estudos relataram que a elevação da temperatura aumenta a taxa de atividade enzimática, além de aumentar a pressão no interior das plantas, diminuindo a resistência da mesma, e, conseqüentemente aumentando as emissões de COV's (PEÑUELAS & LLUSIÀ, 2001). Este acréscimo ocorre também quando a planta está sob estresse hídrico, provavelmente devido ao colapso das estruturas celulares, facilitando sua disponibilização para o meio (JANSEN 2011). Pelo menos 29 diferentes compostos, dentre eles: (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, 1-hexenol, acetato de hexilo e (E) etilo-2-hexenilo que estão relacionados à atividade da lipoxigenase, foram observados em plantas de maçãs submetidas à seca durante 14 dias (EBEL *et al.*, 2006).

Similarmente, a alteração súbita de luz resultou em elevadas taxas de produção e emissão de voláteis (hexanal e acetaldeído) em folhas de álamo cinzento (*Populus x canescens* (Aiton) Smith), após transições de luminosidade claro-escuro. Em contrapartida, quando as plantas foram submetidas à condições anóxicas, o acetaldeído foi o único composto liberado quando houve alteração na luz, indicando que o hexanal da mesma forma está relacionado as reações da lipoxigenase que ocorreram durante as transições de luminosidade em condições aeróbias (GRAUS , *et al.*, 2004).

Com relação aos estresses bióticos, vários trabalhos vêm demonstrando a liberação dos químicos voláteis pela planta em diferentes patossistemas, podendo ser regulados por bactérias (HUANG *et al.*, 2012), fungos (MENDGEN *et al.*, 2006) e insetos (PICKETT *et al.*, 2012; TAMIRU *et al.*, 2012).

Em estudo sobre a interação *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pv., Huang e colaboradores (2012) verificaram que o volátil (E)- β -cariofileno produzido tem ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias. Os autores também observaram o aumentando dos níveis de resistência da planta submetida a ataques patogênicos, e, conseqüentemente, maiores níveis de produção de sementes. Outros estudos mostraram que o composto (E)- β -cariofileno é eficaz na inibição do crescimento de vasta gama de bactérias, dentre elas, espécies de gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* (SABULAL *et al.*, 2006; DELAMARE *et al.*, 2007; KIM *et al.*,

2008). Esse volátil também possui função atrativa a inimigos naturais de herbívoros, colaborando com a proteção da planta (HUANG *et al.*, 2012).

Tamiru *et al.* (2012), através da investigação da interação entre milho (*Z. mays*) e o inseto *Chilo partellus* Swinhoe, responsável pela doença da broca no caule, puderam constatar a emissão de diferentes COV's quando as plantas eram ovopositadas pelo inseto. Dentre os compostos HIPVs (herbivore induced volatile) identificados é citado o (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene (DMNT). Os autores, ainda, demonstraram o envolvimento deste composto nas respostas de defesa indireta da planta, contribuindo na atração de inimigos naturais e parasitóides de ovos e larvas da broca.

Estudos demonstraram que os insetos possuem sensores capazes de detectar químicos voláteis identificados como semioquímicos, da mesma forma que são capazes de detectar feromônios sexuais. Assim como outros COV's, estes semioquímicos podem ser liberados de forma natural pela planta ou, através da indução por ataque patogênico. Estes ativam moléculas lipofílicas (SLMS – *Small lipophilic molecules*) da planta e, conseqüentemente, emitem estes voláteis que podem ser utilizados no mecanismo de defesa do hospedeiro, atraindo parasitoides dos ovos de insetos – praga. (PICKETT *et al.*, 2012).

Em algodão (*Gossypium hirsutum*), um *cis*-jasmonato foi identificado como um SLM, conduzindo a liberação de (E, E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT), responsável por repelir o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*) (BIRKETT *et al.*, 2000; BRUCE *et al.*, 2003). Na soja (*Glycine max*), esse semioquímico foi também relacionado com a atração dos parasitoides do percevejo *Euschistus heros* (MORAES *et al.*, 2009).

Mendgen *et al.* (2006), estudando a relação do fungo causador de ferrugem *Uromyces fabae* e seu hospedeiro fava (*Vicia faba* L.), puderam constatar que após a inoculação houve a emissão de alguns COV's. A partir destes resultados, os autores avaliaram o efeito destes compostos no desenvolvimento do fungo *P. pachyrhizi* em folhas de soja, sendo constatado que a mistura de três voláteis (nonanal, decanal, e acetato hexenil) foi capaz de promover o desenvolvimento haustorial do patógeno 24 horas após a

inoculação. Já, o terpenoide farnesil acetato foi avaliado isoladamente, sendo possível perceber que o mesmo foi capaz de regular negativamente o desenvolvimento haustorial, já que suprimiu a diferenciação de células do fungo e além disso, a formação de colônias foi reduzida em 98%. Entretanto, ainda não se pode afirmar se o fenótipo foi decorrente de ação direta do COV nos mecanismos de defesa da soja ou se o composto em si possui efeito inibitório (MENDGEN *et al.* 2006).

Após a inoculação do *P. pachyrhizi* em plantas de soja suscetível (Embrapa 48) e resistente (PI 230970) à ferrugem, Brito Júnior (2013), identificou o COV (E,E) α -farneseno, que teve sua produção reduzida nas horas iniciais após a infecção, em ambos os genótipos. Tal redução foi inversamente proporcional ao nível de sintomas da planta, isto é, quanto mais evidente o sucesso da infecção, menor foi a produção do COVs.

Em trabalhos prévios do estudo de transcriptomas de soja em resposta a infecção com *P. pachyrhizi*, algumas enzimas que participam da via do MVA foram identificadas como diferencialmente expressas em plantas de soja com diferentes *backgrounds* quanto aos genes de resistência. Foi possível identificar a difosfomevalonato descarboxilase (CHOI *et al.* 2008), mevalonato-quinase (TREMBLAY *et al.* 2010), acetil-CoA acetiltransferase e fosfomevalonato-quinase (TREMBLAY *et al.* 2011), geranyl difosfato sintase e hidroximetilglutaril-CoA sintase (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

2.2.4 Gliceolinas

As fitoalexinas compõem um grupo de metabólitos secundários de baixo peso molecular com arranjos químicos variados, que possuem ação antioxidante, antimicrobiana, antinematoides, bem como ação antifúngica. São produzidas em diferentes vias metabólicas que podem atuar conjuntamente, a exemplo a rota do mevalonato, ácido chiquímico e metileritritol fosfato, depende do organismo e o compartimento intracelular onde é produzido. Nas células vegetais, como já mencionado anteriormente, a via do mevalonato opera no citosol/RE, enquanto que enzimas da via MEP estão localizadas nos plastos.

Para que haja a síntese destes compostos, assim como os COVs, é indispensável que ocorra a indução através de estresses físicos, químicos e/ou biológicos. A indução ocorre por meio de moléculas elicitoras, que se ligam a receptores específicos da membrana celular promovendo a defesa da planta através da produção destas fitoalexinas.

As gliceolinas se caracterizam como a principal fitoalexina encontrada na soja, e é uma molécula importante para a defesa desta leguminosa contra fitopatógenos (GOUVEA *et al.*, 2011). Trata-se de um pterocarpano (isoflavonoide), contendo um éter cíclico proveniente de C₅ da substituição prenil, que atuam na inibição da ativação de enzimas fúngicas, na desorganização dos conteúdos celulares, na ruptura da membrana plasmática, inibindo a viabilidade celular em 86% (GOUVEA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014). Sua produção se inicia (em partes) na via dos fenilpropanoides que durante o estímulo químico/físico/biológico, hidrolisam malonilglucosil-daidzeína e malonilglucosil-genisteína que são isoflavonas pré-formadas. Em seguida ocorre a liberação da daidzeína, que é uma molécula precursora da gliceolina e da genisteína (figura 7). A partir desta rota é possível formar quatro gliceolinas isômeras (figura 8) (SIMÕES, 2004).

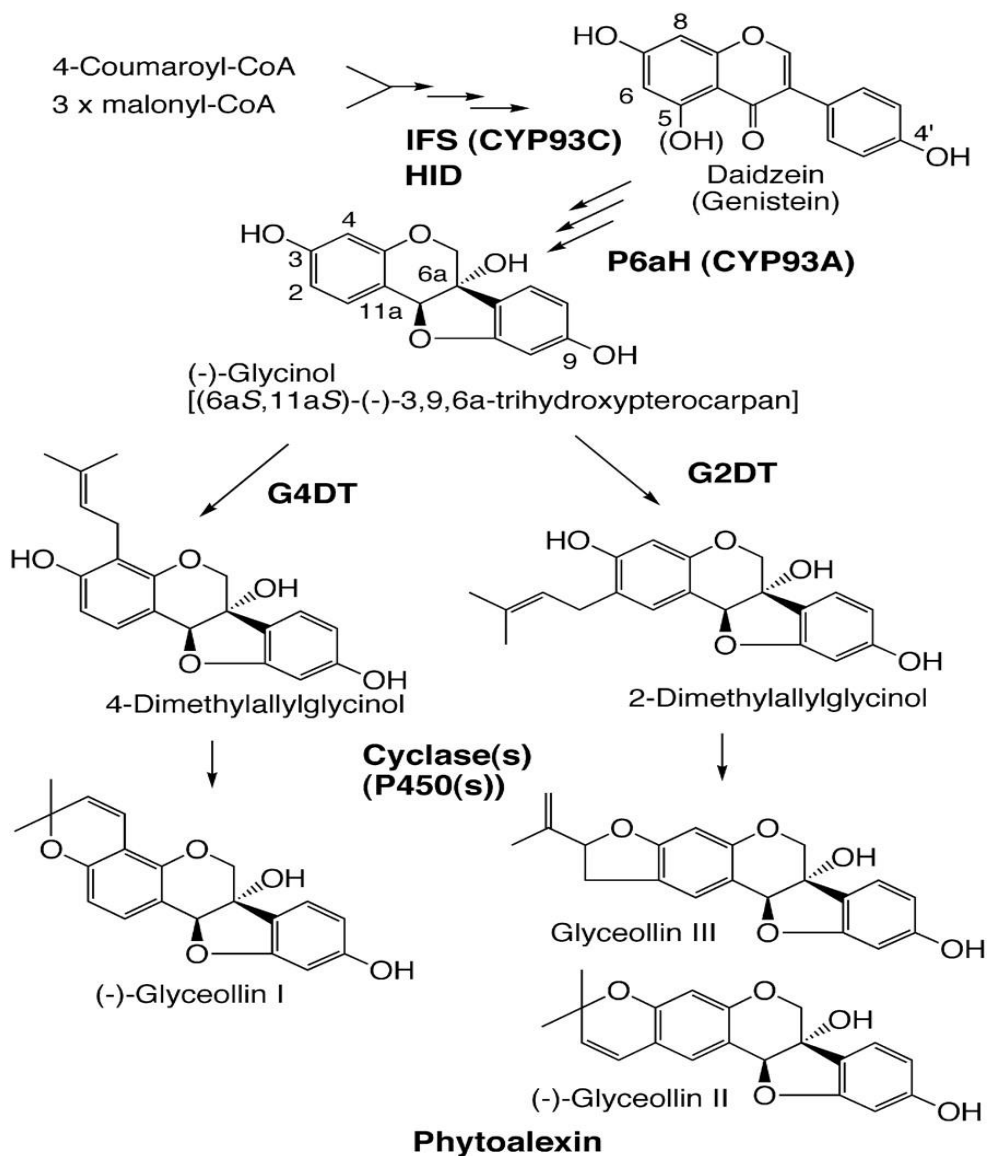


Figura 7. Adaptado. Biosíntese de gliceolinas em soja a partir do precursor daidzeína. Abreviações: HID, 2-hidroxisoflavanona desidratase; IFS, 2-hidroxisoflavanona sintase; P6aH, pterocarpano 6a-hidroxilase; G2DT, dimetilalil difosfato: (-)-glicinol 2-dimetilaliltransferase.



Figura 8. Adaptado. Estruturas isoméricas de gliceolina. (SIMÕES, 2004)

A participação da via MVA na produção de gliceolina se dá pela ação da enzima isopentenil-difosfato Δ -isomerase, que converte isopentenil difosfato em dimetilalil difosfato (DMAPP). Este composto fornece a unidade isoprenil pela ação da enzima prenilase 4-dimetilaliltransferase (G4DT - EC2.5.1.36), que catalisa a adição do DMAPP ao carbono C2 ou C4 do esqueleto pterocarpano (glicinol). A rota MEP também produz DMAPP (que da mesma forma é utilizado como substrato) utilizado na formação de gliceolina plastidial, o produto final gerado por esta via é a gliceolina I, e, a enzima responsável pela sua produção a GD4T é produzida no RE, local associado à via MVA (AKASHI *et al*, 2009).

Em estudos realizados em soja verificou-se o desencadeamento da síntese de gliceolina como resposta de defesa quando a planta está sob algum tipo de estresse (MAZARO *et al* 2008; SILVA 2013; AKASHI *et al* 2009; GOUVEA *et al.*, 2011 LIU *et al*, 2014). Akashi *et al* (2009) reportam a indução da produção de gliceolina em soja em resposta a *P. pachyrhizi* após uma semana de infecção, relacionada com a rota tradicional (MEP), envolvendo os precursores daidzeína e dimetilalil difosfato-DMAPP e a ação da enzima G4DT. Estes autores verificaram ainda que as gliceolinas são armazenadas na forma de glicosídeos, facilitando a rápida síntese destas fitoalexinas durante ataque patogênico.

Lygin *et al*, (2009), estudando a diferença no metabolismo fenólico durante três semanas na interação soja-*P. pachyrhizi*, verificaram que houve o acúmulo de gliceolinas. Tal fenômeno foi observado principalmente nos genótipos que continham genes de resistência quando comparados com as mesmas plantas falso-inoculadas. Verificaram, também, alterações significativas no desenvolvimento do fungo quando em contato com o composto, indicando novamente que esta fitoalexina está envolvida nos processos de defesa da planta. Vários outros estudos comprovam esta relação (MAZARO *et al* 2008,; SILVA 2013; AKASHI *et al* 2009; GOUVEA *et al.*, 2011 LIU *et al*, 2014), entretanto, uma compreensão completa dos mecanismos moleculares que conferem este incremento de gliceolina e as rotas envolvidas com a produção da mesma, permanecem elusivas.

2.3 Respostas Moleculares de Defesa Mediadas por Genes de Resistência

Nos últimos anos, na tentativa de melhor compreender a interação do patossistema soja- *P. pachyrhizi* vários estudos têm sido realizados focando em diferentes etapas da infecção. Choi *et al.* (2008) estudaram a expressão gênica da soja Komata PI 200492 que apresentava o gene de resistência *Rpp1* e a cultivar susceptível Williams. Então, após a inoculação com dois diferentes isolados de *P. pachyrhizi* Taiwan 72-1 (TW72-1) e Havaí 94-1 (HW94-1) a partir dos resultados foi construída uma biblioteca, considerando-se *mock*-inoculadas e inoculadas, além do tempo de infecção 1, 6, 12, 24, e 48 horas após inoculação (hai). Os autores verificaram que o processo de colonização do fungo (germinação do esporo, formação do apressório e penetração nas células hospedeiras) é semelhante tanto para as reações suscetíveis como para as resistentes e ocorre no período de 24 horas.

Constataram também que classes de genes que codificam enzimas oxidantes, tais como o lipoxigenases e peroxidases foram reguladas pela interação planta-patógeno, estas enzimas são importantes para o mecanismo de defesa da planta, pois, ajudam a célula a se proteger contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (PINTO *et al.*, 2006). Espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham várias funções na defesa, a partir da catálise de fortificação da parede celular (BRADLEY *et al.* 1992), ajudam também na cascata de sinalização (LEVINE *et al.*, 1994), na produção de radicais livres tóxicos (BRISSON *et al.*, 1994). Os danos oxidativos na célula hospedeira também podem levar à necrose, sugerindo que a interação complexa de altas concentrações/níveis de óxido pode desempenhar importante função sob a capacidade da célula hospedeira em resistir ao ataque do fungo (PASSARDI *et al.*, 2006; SHAH, 2005).

Van de Mortel *et al.* (2007) depois de examinar o perfil de expressão gênica da soja infectada por *P. pachyrhizi* em um genótipo resistente (PI 230970- *Rpp2*) e, em outro susceptível (Embrapa 48) verificou que esta interação tem sido referida como uma resposta de defesa bifásica. Comparando o perfil de expressão gênica entre plantas inoculadas e *mock*-

inoculadas, identificou-se que houve uma primeira indução de expressão de genes de defesa em 12 hai do fungo. Cerca de 24 hai a expressão gênica retorna ao perfil mock-inoculadas e permanece até ocorrer a segunda indução, em torno de 72 hai na interação incompatível de plantas resistente. Tal fato possivelmente foi atribuído à sinalização mediada pelo gene *Rpp2*. Esta indução foi também observado nas plantas suscetíveis após 96 hai, porém, não com a mesma intensidade. Embora os maiores níveis de indução dos genes relacionados à defesa tenham sido observados no genótipo resistente, houve no genótipo suscetível um maior número de genes diferentes expressos.

Verificou-se o reconhecimento inespecífico da FAS sugerindo ativação de mecanismos de defesa basais, sendo observada resposta inicial semelhante em ambos os genótipos (Embrapa 48 e PI 230970). De acordo com Van de Mortel *et al.* (2007), este tipo de reconhecimento é provável que tenha sido induzido por moléculas de sinalização do fungo durante sua penetração em células epidérmicas, que morreram em ambas as situações de interação planta-patógeno. Ao contrario, a existência de uma segunda resposta exibida pela interação incompatível, se deve à presença do *locus* de *Rpp2* no genótipo resistente, que promove o reconhecimento de proteínas de avirulência (*avr*), emitidas pelo fungo durante a interação do haustório, desencadeando uma resposta de defesa pela planta.

Em geral, os estudos relacionados com a expressão gênica da soja em resposta ao fungo *P. pachyrhizi*, levam à identificação de várias classes de genes funcionais que são regulados positivamente durante a interação planta-fungo, incluindo os que estão associados com a sinalização de defesa, regulação da transcrição de fatores de transcrição WRKY e MYB, de enzimas envolvidas em metabolismos primários e secundários, dentre outras funcionalidades (PANDEY 2011). Estudos relatam que genes envolvidos na produção de fenilpropanóides são regulados durante a infecção da FAS, sugerindo um direcionamento para o desenvolvimento de resistência ao patógeno (CHOI *et al.*, 2008; VAN DE MORTEL *et al.*, 2007).

Este trabalho foi seguido por Pandey *et al.* (2011), que utilizaram a técnica de VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) para silenciar 140 genes

identificados por Van de Mortel *et al.* (2007). Os autores identificaram 11 genes que são essenciais para mediar a resistência de *Rpp2*. Dentre eles, observaram que os genes GmEDS1, GmPAD4, e GmNPR1 quando silenciados resultaram em áreas cloróticas e lesão TAN com quantidade abundante de pústulas na PI 230970, indicando fenótipos de perdas de resistência, e redução dos mRNA transcritos. A partir dos resultados, os autores propuseram que a resistência mediada por *Rpp2* depende da via do ácido salicílico (SA), em razão da codificação de lipase/esterase por estes genes, que são proteínas que regulam o acúmulo de SA (PANDEY, 2011). Com isso, demonstrou-se que os fatores de transcrição (FT) WRKY, DBTF e MYB regulam a expressão dos genes GmOMT, GmPAL1. Os quais possivelmente estão envolvidos no processo de lignificação da parede celular da soja, dificultando a colonização do fungo, bem como outros genes relacionados à via fenilpropanóide (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; PANDEY, 2011).

A resposta de defesa bifásica observada na resistência mediada por *Rpp2* foi também constatada na PI 462312, que carrega o gene *Rpp3* (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Por volta de 12 hai a expressão genica foi up-regulada em ambas as interações (compatível e incompatível). Estas expressões foram correlacionadas com a penetração do fungo através da epiderme e durante a interação biotrófica específica, correspondendo à formação do haustório. Seguido de repouso que ocorreu entre 24-48 hai. Neste período o fungo continua se desenvolvendo, porém, sem indução de respostas de defesa do hospedeiro. Entretanto, em torno de 72 hai houve a segunda resposta na interação incompatível, que foi caracterizada por alterações mais rápidas na expressão gênica em resposta ao isolado avirulento, e correlacionado a proliferação de haustório, considerando-se que até 144 hai esta resposta não foi detectada na interação compatível.

Estes perfis de expressão gênica estão de acordo com os resultados observados por Van de Mortel *et al.* (2007), que aplicam inicialmente defesas da soja contra FAS usando mecanismos basais de resistência. Durante a segunda etapa da expressão diferencial de genes, proteínas *Rpp* promovem uma resposta mais rápida em genótipos resistentes por reconhecimento de

proteínas avr depositadas pelo fungo. Para quase todas as categorias funcionais genicas encontradas no experimento, uma resposta bifásica foi observada. Outro fator de interesse é que a supressão dos genes relacionados com o processo da fotossíntese ocorreu na interação incompatível, e tem sido relatada em outras interações incompatíveis no patossistema soja-*P. pachyrhizi*. Considerando as respostas mediadas por *Rpp3*, Schneider *et al.* (2011) sugeriram que foram representados em um padrão de expressão de genes semelhantes em ambas interações, contudo com intensidades diferentes.

O gene candidato para resistência mediada no *locus Rpp4* foi identificado por Meyer *et al.* (2009), após sequenciar um BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) que continha o *locus Rpp4* na cultivar de soja suscetível, Williams 82, três genes foram identificados como candidatos a ser o *locus Rpp4*. Estes genes pertencem à família CC-NBS-LRR (*Coiled-Coil-Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat*). A partir do sequenciamento do DNA genômico dos dois genótipos encontrou-se cinco genes candidatos à resistência mediada por *Rpp4* (*Rpp4C1- Rpp4C5*) na PI 459025B (resistente), e três na cultivar W82 (susceptível), e através de análises por VIGS foi confirmado que estes genes são candidatos à resistência no *locus Rpp4*. É possível que as diferenças nos números de genes entre W82 e (PI) 459025B sejam devido à duplicação ou recombinação desigual.

Baseando-se nos resultados obtidos, os autores compararam os genótipos susceptíveis e resistentes, e foi constatado que *Rpp4C4* é altamente expresso na (PI) 459025B e ausente no genótipo W82, sendo considerado o principal candidato à resistência mediada *Rpp4* à FAS. Portanto, o relevante é que todos os candidatos *Rpp4* apresentaram elevada similaridade, é possível que uma pequena diferença na sequência de aminoácidos possa ser responsável pela resistência (MEYER *et al* 2009).

A resposta bifásica observada na resistência *Rpp4*-mediada é semelhante à *Rpp2* uma vez que a resposta de resistência coincide com o desenvolvimento do haustório. É provável que o gene *Rpp4* detecta a presença de uma proteína efetora secretada pelo fungo neste momento. Acredita-se que

a localização citoplasmática de *Rpp4C4* (PI459025B) é compatível com a hipótese de que o efetor pode ser produzido no haustório e secretado para as células hospedeiras em que este reconhecimento ocorre (MEYER *et al.* 2009). Curiosamente, as regiões que contêm o *locus Rpp4* estão duplicadas no cromossomo 9, tem um intervalo de 162 kb, que corresponde à região de genes candidatos *Rpp4*. Considerando o evento alopoliploide no genoma da soja, confirmado por Gill *et al.* (2009), na junção de dois genomas ancestrais foi formado por um genoma ancestral com o cromossomo 9 (*Rpp4 locus* com gap). Por conseguinte, ele pode ser uma explicação para o número de leguminosas hospedeiras para FAS, considerando-se a possibilidade de uma ausência completa de genes candidatos para *Rpp4* nas espécies ancestrais (MEYER *et al.*, 2009).

Uma possível explicação para a raridade dos genes *Rpp4* candidatos é que o custo de manutenção de *Rpp4* quando nenhum agente patogênico está presente pode ser maior do que o benefício da resistência durante o ataque do fungo. A perda de genes por meio de seleção pode também explicar esta raridade de resistência FAS em soja e outras leguminosas. A identificação do gene responsável pela resistência mediada por *Rpp4* é importante não só para impacto agrônômico, mas, também para estudos evolutivos de genes R em genomas com históricos de poliploidia.

Panthee *et al.*, 2007 identificaram genes que podem estar envolvidos à uma resposta de defesa da soja contra *P. pachyrhizi*. Infectaram a cultivar 5601 T com esporos do fungo e 72 hai através de análises de microarranjos verificaram que a maioria dos genes induzidos tinham funções relacionadas à resposta de defesa do hospedeiro. Dentre estes genes estão os que codificam uma proteína de choque térmico-relacionados ácido salicílico (HSP), receptor-like quinase 1 (ALK 1), glutathione s-transferase (GST) e da chalcona-sintetase.

A fim de esclarecer as etapas finais da infecção da FAS, Tremblay *et al.*, 2009, realizaram a análise de transcriptoma do fungo a partir das fases uredial obtidos pelo método LCM - *Laser Capture Microdissection*. A cultivar susceptível Williams 82 foi inoculada com o isolado de *P. pachyrhizi*, aos 10

dias após a inoculação (dai) foram observadas pústulas com esporos em diferentes estágios de desenvolvimento. Os autores identificaram alguns genes importantes de *P.pachyrhizi* que estavam relacionados com a produção da energia necessária para a manutenção (crescimento e reprodução) do fungo; por exemplo, a expressão dos genes da isocitrato desidrogenase que estão envolvidos na produção de ATP. Estes genes eram altamente expressos entre 20-48 hai, período que ocorre consumo de energia para a formação do haustório. Esta expressão se eleva novamente aos 10 dai, momento em que ocorre produção de esporos e, conseqüentemente, há gasto de ATP. Além disso, outra semelhança foi o domínio de DEK, encontrado na proteína de quitina sintetase que foi expresso entre 4 e 10 dai. Período correspondente com o processo de produção de esporos, considerando-se que a quitina é um dos componente da parede celular de fungo.

Além disso, é de conhecimento que a formação e diferenciação dos esporos no uredósporos necessitam de uma etapa de fosforilação de proteínas. Este processo pode ser conduzido por diferentes enzimas, tais como a proteína quinase C, AMP cíclico (cAMP), PP1 fosfatase (envolvida na rápida a proliferação de células no início da infecção) e a proteína serina/treonina. A partir dos resultados obtidos foi constatado estas enzimas estão presentes em bibliotecas de cDNA do fungo. Os resultados evidenciaram também aos 10 dai a expressão do gene da catecol dioxigenase, que é responsável por ocasionar a digestão da parede celular vegetal e a liberação de esporos. Os genes que codificam enzimas dioxigenases também estão envolvidos neste processo, pois, promovem a destruição de compostos aromáticos, como a lignina, o principal componente da parede celular da planta (TREMBLAY *et al.*, 2009).

Tremblay *et al.*, (2010), realizaram análises de transcriptoma com o propósito de melhor compreender a interação do patossistema soja-P. *Pachyrhizi*, para isso utilizaram a cultivar susceptível Williams 82 e o isolado altamente infeccioso MS06-1 (coletados em Mississippi-2006). Observaram que o parênquima esponjoso e as células paliçádicas próximas à região de formação de pústulas tinham uma cor marrom aos 10 daí. Através de análises de microarrajos, usando RNAm extraído diretamente a partir dessas células,

constataram que 2.982 genes de soja apresentaram uma expressão diferencial quando comparado com plantas mock-inoculadas. Um total de 380 genes foram *up*-regulados e 1.640 genes foram reprimidos, sendo que 1601 eram inéditos deste trabalho, em comparação com os encontrados por Van de Mortel *et al.* (2007) devido à especificidade fornecida pela técnica de LCM (*Laser Capture Microdissection*).

Dentre os genes *down*-regulados observados por Tremblay *et al.* (2010) estão incluídos alguns relacionados aos processos de energia (fosfoenolpiruvato carboxilase-PEP), e supressão completa de diversos genes envolvidos no metabolismo (pentoses, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), amido, sacarose, galactose, inositol fosfato e glicólise). Os autores ainda observaram a repressão de genes relacionados também à fixação de carbono (triosefosfato isomerase e transcetolas), à síntese de proteínas (nitrito redutase) e à fixação de nitrogênio (asparagina sintase). Dentre os genes que tiveram expressão aumentada, estão os genes associados à doença e defesa da planta (produção de fenilpropanóides). Embora a indução de genes de defesa, não tenha sido eficiente para produzir uma resposta eficaz, os mesmos em fase posterior a infecção, a planta continua tentando combater a infecção do patógeno (TREMBLAY *et al.*, 2010).

Estes mesmos autores em 2011 novamente estudaram a interação soja-ferrugem, a fim de realizar a análise completa do transcriptoma aos 10 dai, permitindo maior percepção da propagação do fungo e a detecção de possíveis genes alvos para se deter esta proliferação (TREMBLAY *et al.*, 2011). Foram utilizados o genótipo susceptível Williams 82 e o isolado MS06-1, e 10 daí os autores obtiveram o perfil de expressão gênica através da técnica de RNA-seq. Os autores puderam observar que os genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, foram *down*-regulados neste período. Assim como o metabolismo de lipídeos, incluindo glicerolipídeo, glicerofosfolipídeo, esfingolipídeos e biossíntese de esteroides e terpenoides. A produção de farnesil-difosfato foi diretamente prejudicada pelos diversos genes que foram *down*-regulados. Sabe-se que o farnesil-difosfato é responsável por sintetizar os esteroides; eles codificam enzimas envolvidas na via dos terpenoides como

fosfomevalonato quinase, que estão correlacionados com a produção de metabólitos secundários que auxiliam nos mecanismos de defesa da planta. Constatou-se também, que genes envolvidos com os transportes de água e UDP-galactose foram fortemente *down*-regulados. Fato que pode ocasionar estresse hídrico na planta e, assim, contribuir para o sucesso da infecção. Os fatores de transcrição MYB, WRKY e MIKC, envolvidos nas respostas ao estresse sofrido pela soja, também foram negativamente regulados. Os genes que estão envolvidos na transdução intracelular de comunicações e/ou sinais de fatores externos foram regulados positivamente. Tais genes têm a função de iniciar mudanças necessárias no metabolismo do hospedeiro a fim de promover respostas de defesa à FAS (TREMBLAY *et al.*, 2011).

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, Tremblay *et al.*, (2013) estudaram através da técnica RNAm-Seq a abundância de transcrição na soja quando infectada pela ferrugem, em tempos específicos: 15 segundos (s) representando pré-penetração, 7 e 48 horas (h) representando a colonização, e 10 dai representando a esporulação, em soja suscetível (Williams 82). Foi verificado que, em todos os pontos temporais: a produção de energia, o metabolismo de nucleotídeos, e a síntese de proteínas são as principais prioridades para infecção e desenvolvimento do fungo. Isso confirma os dados de expressão de vários transcritos que codificam enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa e metabolismo de carboidratos (glicólise, glioxilato e dicarboxilato, fosfato pentose, piruvato). Entretanto, em 15 sai (segundos após a infecção), transcritos que codificam enzimas envolvidas na produção de ATP eram abundantes, a fim de, fornecer energia suficiente para a germinação dos esporos, como observado com a expressão de muitos transcritos que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons. Neste período precoce, transcritos que codificam proteínas envolvidas na síntese de RNA foram também abundantes, mais do que transcritos codificando genes envolvidos na síntese de DNA e proteínas; o RNA transcreve todos os genes necessários para a o passo subsequente de crescimento fúngico (TREMBLAY *et al.*, 2013).

As 7 hai, pouco depois da germinação mas ainda durante o alongamento do tubo germinativo, os transcritos que codificam enzimas

envolvidas na desoxirribonucleótido e síntese de DNA eram abundantes. As 48 hai, transcritos para as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato quinase, ambas correlacionadas ao metabolismo de aminoácido, eram muito abundantes devido ao aumento da síntese proteica para a formação dos haustórios. Durante a esporulação em 10 dai, o fungo requer energia super expressando os genes responsáveis pelo metabolismo de carboidratos e lipídeos, bem como, a expressão de transcritos que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos (TREMBLAY *et al.*, 2013).

Morales *et al* (2013) estudaram a interação soja-ferrugem a partir de genótipos Williams 82 (susceptível) e PI459025B (Rpp4) inoculados e falso-inoculados com o isolado HW94-1, afim de, elucidar os genes diferencialmente expressos nas vias de resistência da soja contra o fungo. Nos períodos 12, 24, 72, 144, 216, e 288 hai foram identificadas duas resposta bifásicas para os genes considerados comum em ambos os genótipos. A primeira indução ocorreu em 12hai que foram “silenciados” até 72hai, período em que houve outro pico de indução em Rpp4, e “silenciados” até 144hai no susceptível, verificou-se que os genes reprimidos em 12hai, foram novamente down regulados em 216 hai. A partir destas observações constatou-se que a maioria dos genes induzidos estava associada com os mecanismos de defesa da planta, enquanto que os genes reprimidos estavam relacionados ao processo de tradução e a fotossíntese.

Através da transferência de CcRpp1, um receptor intracelular de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) para soja, Kawashima *et al*, (2016) verificaram que após a infecção de *P. pachyrhizi* houve reconhecimento específico do patógeno e a ativação de um conjunto diversificado de respostas de defesa da planta. Os autores afirmaram, ainda, que esta não é a única fonte de genes de resistência à FAS, e que muitas outras leguminosas podem conter estes genes. Após a transferência destes genes em genótipos que continham resistência G119-99, G59-95 e o genótipo susceptível G146.-97, os autores verificaram que o loci introduzido possuía 4 regiões preditas de NB-LRR (nucleótidos de ligação- leucina rica de repetição). O domínio LRR, apresenta

uma variedade de aminoácidos do tipo leucina, que estão associados ao reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro durante o processo infeccioso. Estas classes de genes conferem resistência a copiosos patógenos abrangendo vírus, bactérias, fungos e nematóides (ROSSI *et al.*, 1998). E, mutações neste domínio LRR das regiões NB 1, 2, 3, 4 podem resultar em especificidade diferencial de reconhecimento. Os dados observados no estudo, também sugeriram que a NB-2 denominado de CcRpp1 em G119-99 é o único gene que continha uma expressão basal, e quando em homozigose conferiu ausência de lesões visíveis.

Apesar de vários estudos realizados visando melhor compreensão da interação planta-patógeno, os mecanismos físicos e químicos de infecção da FAS, bem como, os mecanismos moleculares de defesa da planta não são conhecidas com precisão, mas têm se realizado grandes avanços. Estratégias contra *P. pachyrhizi* foram elucidados em diferentes etapas das infecções. Estas abordagens são fundamentais para a intervenção correta e eficiente, considerando a capacidade do fungo de evitar a percepção da planta. A busca contínua de fontes de resistência contra a FAS é muito importante, considerando a interação dinâmica e evolutiva exibida na interação soja-*P. pachyrhizi*.

3. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo visa caracterizar o envolvimento do COV (E,E) α -farneseno nos mecanismos de defesa da soja em resposta a infecção com o fungo *P. pachyrhizi*.

3.1 Objetivos específicos

- Determinar se a redução dos níveis de composto orgânico volátil (E,E) α -farneseno após a infecção por *P. pachyrhizi*, está relacionada com a regulação da expressão dos genes da rota do mevalonato;
- Determinar se a regulação dos genes da rota do mevalonato e das prenilases, após a infecção por *P. pachyrhizi*, é dependente do background genético quanto a presença dos diferentes genes de resistência à ferrugem (*Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*) e um genótipo suscetível;
- Demonstrar se a regulação dos genes da rota do mevalonato e das prenilases, envolvidos na produção do composto orgânico volátil (E,E) α -farneseno, é específica da interação soja-*P. pachyrhizi* através de análises *in silico* em bancos Transcriptômicos de soja;
- Avaliar o efeito direto do composto orgânico volátil (E,E) α -farneseno no desenvolvimento da FAS;
- Caracterizar a correlação da via MVA na produção de (E,E) α -farneseno e de gliceolinas.

4. JUSTIFICATIVA

Este estudo busca elucidar o envolvimento do composto orgânico volátil (E,E) α -farneseno no patossistema soja- *P. pachyrhizi*, visando contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos de ataque e defesa a nível molecular entre o patógeno e seu hospedeiro, respectivamente. A confirmação do envolvimento deste COV especificamente nas respostas da soja a *P. pachyrhizi* e a interpretação de suas funcionalidades, bem como o papel desempenhado pelas gliceolinas nesta interação, podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle, como medidas preventivas relacionadas à detecção precoce do patógeno, anterior ao surgimento de sintomas, ou na contenção direta da doença, caso o COV tenha efeito satisfatório na redução da severidade.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia Vegetal e Ecologia Química da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA-Soja) localizada em Londrina – Paraná.

5.1 Material biológico

No experimento, foram utilizados quatro genótipos de soja: a cultivar Williams 82 (WH82) como padrão suscetível e as plantas introduzidas (PI) contendo genes de resistência à FAS, cada uma apresentando um gene específico, previamente caracterizados: PI230970 (Rpp2), PI459025 (Rpp4) e PI200487 (Rpp5). As sementes empregadas foram obtidas no Banco Ativo de germoplasma da Embrapa – Soja (BAG).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($> 60\%$) monitoradas, e 12h/12h de fotoperíodo, onde permaneceram nestas condições até o estágio de desenvolvimento V2 (21 dias). Cada parcela correspondeu a vasos individuais contendo três plantas cada, seguindo o delineamento em blocos casualizados (DBC) com três blocos, e três fatores de avaliação: tempo de coleta (12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas após inoculação - hai), genótipos (Williams 82, PI230970, PI459025 e PI200487) e tipo de infecção (inoculado – “inoc”, e falso inoculado – “mock”), totalizando 144 vasos e 432 plantas.

5.2 Inoculação de *P. pachyrhizi*

O isolado do fungo utilizado como fonte de inóculo pertence a Coleção de Microorganismos da Embrapa Soja. O isolado foi coletado no município de Uberlândia-MG na safra 2011/12 e foi purificado a partir de urédias individuais em folhas de soja, conforme descrito por Darben (2013). O isolado foi mantido em cultura em folhas destacadas de soja suscetíveis

(Embrapa 48), em câmara de crescimento, sob condições adequadas ao desenvolvimento do fungo (Darben, 2013).

Para a inoculação, os urediniósporos de *P. pachyrhizi* foram suspensos em água destilada com 0,05% (v/v) de “Tween 20” (Uniqema) ajustadas a uma concentração final de aproximadamente 5×10^4 esporos/mL., e para os “mock” (falso inoculados) foram pulverizados com solução de água destilada e “Tween 20” ausente de esporos.

A inoculação foi realizada no estágio de desenvolvimento V2, de acordo com a escala proposta por FEHR; CAVINES, (1981), por pulverização manual favorecendo a superfície adaxial da planta. Inoculou-se primeiramente as “mock”, evitando possíveis contaminações das mesmas, que foram protegidas por sacos plásticos umedecidos, seguida da pulverização da suspensão com urediniósporos nas demais plantas e cobertura com os sacos plásticos. Estes sacos umedecidos serviram também para garantir a umidade necessária para a colonização do fungo na planta.

5.3 Coleta do material e extração do RNA total

Foram coletados os 2º trifólios de cada planta de todos os vasos, imediatamente embalados em papel alumínio, armazenados em nitrogênio líquido, e, em seguida, acondicionados em ultrafreezer a -80 °C.

Para extração de RNA total as amostras coletadas foram maceradas em graal, previamente resfriado em nitrogênio líquido e acondicionados em microtubo de 1,5 mL. Imediatamente foi adicionado 1 mL de reagente TRIZOL (invitrogen™) (55 °C) e agitado em *tube mixer* por 10 minutos em temperatura ambiente (TA), seguida de centrifugação sob refrigeração (4°C) por 15 minutos à 14000 RPM (20000xg). O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, seguida da adição de 400 µL de clorofórmio. Então, novamente, a amostra misturada em *tube mixer* por 5 minutos em TA. O material foi centrifugado outra vez sob as mesmas condições já citadas por 10 minutos. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para novo microtubo, e este último processo (clorofórmio-mistura-centrifugação) foi repetido.

Cerca de 200 μL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, ao qual foram adicionados 250 μL de tampão *High salt buffer* (0,8M citrato de sódio; 1,2M cloreto de sódio) e 250 μL de isopropanol. A amostra foi misturada em *tube mixer* por 10 minutos em TA e centrifugada mais uma vez durante 10 minutos a 14000 RPM a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet ressolubilizado em 100 μL de água deionizada permanecendo em gelo por 30 minutos. Adicionou-se 10 μL de acetato de sódio e 250 μL de etanol 100%, seguido de mistura em *tube mixer* por 5 minutos e centrifugação por 15 minutos a 20000xg a 4 °C. Cuidadosamente o sobrenadante foi desprezado e ao *pellet*, cerca de 400 μL de etanol 75% foram adicionados, e novamente centrifugados por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet seco em temperatura ambiente. Ao final da extração, foi realizada a ressuspensão do *pellet* acrescentando 30 μL de água deionizada e armazenada em ultrafreezer a -80°C.

Alíquotas de 2 μL de RNA total foram utilizadas para a quantificação em espectrofotômetro através do equipamento NanoDrop ND 1000 (Uniscience) a 260nm.

5.4 Síntese do cDNA

O RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, para posterior síntese do cDNA que foi realizada utilizando o kit M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Foram adicionados 0,5 μg de RNA total e 2 μL de iniciador randômico em um volume final de 9 μL , colocados em termociclador por 3 minutos a 80°C e em seguida colocados no gelo por 1 minuto. Após, foi adicionado o mix contendo 5 μL de tampão 5X RT-buffer, 4 μL de dNTP's (2,5 mM), 1 μL de DTT (0,1 M), 1 μL da enzima transcriptase reversa e 2 μL de água DEPC e incubado em temperatura de 37°C por 1 hora, seguido de 65°C por 10 minutos. Após a síntese, as amostras foram estocadas a -20 °C.

5.5 Análise da expressão diferencial de transcritos envolvidos na biossíntese de COV por RT-qPCR.

A seleção dos genes da via do mevalonato para análise de expressão diferencial por RT-qPCR foi realizada com base na literatura, a partir de estudos de expressão diferencial de genótipos de soja, contendo diferentes genes de resistência: PI 230970 (Rpp2), PI 459025 (Rpp4), PI 200487 (Rpp5) e o genótipo suscetível Williams 82, submetidos ao ataque da ferrugem asiática (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011; MORALES *et al.* 2013). A fim de, esclarecer se o α -farneseno apresenta papel direto no processo de defesa da planta contra o fungo, e, se o decréscimo do COV é decorrente da supressão de genes participantes na sua via metabólica, foram selecionados alguns destes genes, que estão destacados em vermelho na figura 9 retirada do Kegg.¹

Sete genes que correspondem às enzimas: acetil-CoA acetiltransferase (E.C. 2.3.1.9), hidroximetilglutaril-CoA sintase (E.C. 2.3.3.10), mevalonato quinase (E.C. 2.7.1.36), fosfomevalonato quinase (E.C. 2.7.4.2), difosfomevalonato decarboxilase (E.C. 4.1.1.33) e isopentenil-difosfato Δ -isomerase (E.C. 5.3.3.2), da via citoplasmática do mevalonato, que tiveram os níveis down regulados em pelo menos um dos experimentos na interação soja-*P. pachyrhizi* previamente descritos, foram selecionados para o estudo. Adicionalmente mais quatro genes referentes a expressão de prenilases que correspondem a geranyl difosfato sintase (E.C. 2.5.1.1), (2E,6E)-farnesil difosfato sintase (E.C. 2.5.1.10) e geranyl-geranyl difosfato sintase (E.C. 2.5.1.29), bem como a terpeno sintase denominada de alfa-farneseno sintase (GmTPS) (E.C. 4.2.3.46), e a enzima responsável pela produção de gliceolina a gliceolina sintase (E.C. 2.5.1.36) foram analisados. A seleção dos iniciadores para a análise de RT-qPCR foi feito utilizando o programa *Primer3plus*. A lista dos 12 genes, com seus respectivos E.C. e referencia em que foram identificados na seleção se encontra na Tabela 1.

¹ http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00900

A identificação dos modelos gênicos correspondentes aos 12 genes foi conduzida pela busca *in silico* no Banco de dados Phytozome ² utilizando a ferramenta BlastT. Para realizar o blastT obteve-se as sequências específicas para soja no banco de dados de proteína Kegg³, utilizando-se o nomes de cada enzima. Obteve-se a enzima GmTPS (terpeno sintase) alfa-farneseno sintase no trabalho de Liu *et al.*, (2014).

² <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

³ <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

Tabela 1. Lista de enzimas da rota do Mevalonato que foram identificadas no KEGG e seus glymas correspondentes no Phytozome V11.0.

Enzimas	ID Soja	E. C.	Autor
Acetil-CoA acetiltransferase	Glyma17g005300	2.3.1.9	Tremblay <i>et al.</i> , 2011
Hidroximetilglutaril-CoA sintase	Glyma01g215500	2.3.3.10	Schneider <i>et al.</i> , 2008
Mevalonato quinase	Glyma03g239000	2.7.1.36	Tremblay <i>et al.</i> 2010
Fosfomevalonato quinase	Glyma06g127200	2.7.4.2	Tremblay <i>et al.</i> 2011
Difosfomevalonato descarboxilase	Glyma10g279800 Glyma 20g10990.1	4.1.1.33	Choi <i>et al.</i> 2008
Isopentenil-difosfato Δ -isomerase	Glyma18g24230.1	5.3.3.2	–
Geranil difosfato sintase	Glyma17g16600	2.5.1.1	–
(2E,6E)-farnesil difosfato sintase	Glyma15g121400 Glyma09g015600	2.5.1.10	–
Geranil-geranil difosfato sintase	Glyma11g06390.1	2.5.1.29	Schneider <i>et al.</i> , 2008
Alfa-farneseno sintase (GmTPS)	Glyma10g29530.1	4.2.3.46	Liu <i>et al.</i> , 2014
Gliceolina sintase	Glyma13g32110.1	2.5.1.36	–

As reações de RT-qPCR foram conduzidas no equipamento 7900 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Para o cálculo da eficiência de cada reação, foi realizada a quantificação absoluta pelo método de curva padrão, a partir de diluições seriadas da amostra de cDNA (1, 5, 25, 125 e 625 vezes, diluição de 5). Para cada amostra, foram feitas duplicatas com as seguintes condições de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 1 minuto. Para a quantificação relativa foram montadas triplicatas de cada tratamento, sendo utilizadas as mesmas condições de amplificação da quantificação absoluta. Controles negativos contendo apenas água foram usados em todas as reações para verificar a presença de possíveis contaminações. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas logo após o final de cada reação de quantificação. Na dissociação, os produtos de amplificação foram submetidos a temperaturas de 60 a 95°C. O

gene constitutivo β -actina foi empregado como referência endógena, por apresentar maior estabilidade entre os genótipos testados (Lino, 2011).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o Kit Platinum® SYBER® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen – Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Conforme recomendado pela *Applied Biosystems*, uma curva de eficiência de amplificação foi empregada para os pares de primers do gene alvo e do gene de controle endógeno β -actina, utilizados para a normalização das amostras. A curva fornece um valor de inclinação da reta – *slope*, empregado no cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores (*primers*), que deverão ser similares e próximos de 100% (valor 1) para ambos os genes.

As reações de amplificação para quantificação relativa foram realizadas utilizando-se cDNA de cada uma das amostras estudadas. As reações foram feitas em triplicatas e compostas de 8,0 μ L de água MilliQ, 0,5 μ L de ROX, 12,5 μ L de SYBER® Green qPCR SuperMix UDG e 2 μ L de cDNA (~1,5 μ g) em bulk. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2min; 95°C por 2min; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Os dados foram coletados na fase de extensão (72°C). As análises do nível de expressão dos genes foram calculadas e avaliados estatisticamente pelo programa REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002). Adicionalmente, os níveis de expressão foram convertidos em escala calométrica na base log2 e representados pelo Heat Mapa, utilizando os Softwares Cluster e Tree View (Software copyrightc Stanford University 1998-99 e <http://jtreeview.sourceforge.net>, respectivamente)

5.6 Análise *in silico* da expressão diferencial de transcritos envolvidos na biossíntese de COV

O perfil de expressão dos genes selecionados foi avaliado em bancos de expressão, com o objetivo de se averiguar a sua funcionalidade e de

excluir modelos gênicos incorretos. Foi consultado o banco Genevestigator ⁴– Que reúne ESTs de soja identificados nos seguintes experimentos:

Genevestigator:

a) Ensaio formado por plantas de soja (V3) PI462312 (Rpp3) em três tratamentos: com cepa virulenta de *P. pachyrhizi* (TW80-2), com cepas avirulentas (HW94-1) e controles (mock), As análises foram realizadas em 6 pontos: 12hai, 24hai, 72hai, 144hai, 216hai, 288hai⁵.

b) *P. pachyrhizi* estudos 2 e 3: Análise do perfil de expressão de soja PI200492 (Rpp1) com dois tratamentos (HW94-1 ou TW72-1) em diferentes tempos : *P. pachyrhizi* estudo 2 amostras de folhas de PI200492 (6-12hai)/ Mock-inoculado, *P. pachyrhizi* estudo 2 amostras de folhas de PI200492 (intermediário-24hai)/mock-inoculado, *P. pachyrhizi* estudo 2 amostras de folhas de PI200492 (48hai)/ Mock-inoculado, *P. pachyrhizi* estudo 3 amostras de folhas de PI200492 (6-12hai)/Mock-inoculado, *P. pachyrhizi* estudo 3 amostras de folhas de PI200492 (24hai)/Mock-inoculado, *P. pachyrhizi* estudo 3 amostras de folha PI200492 (48hai)/Mock-inoculado⁶.

c) *P. pachyrhizi* estudos 4 e 5: Ensaio com folhas de soja PI230970 (Rpp2) e Embrapa-48, infectadas com FAS, em: *P. pachyrhizi* estudo 4 (6-24hai)/mock-inoculados amostras de folha de PI230970; *P. pachyrhizi* estudo 4 (36-72hai)/mock-inoculados amostras de folha de PI230970; *P. pachyrhizi* estudo 4 (96-168hai)/mock-inoculados amostras de folha de PI230970, *P. pachyrhizi* estudo 5 (6-24hai)/ mock-inoculada amostras de folha de Embrapa 48; *P. pachyrhizi* estudo 5 (36-72hai)/ mock-inoculada amostras de folha de Embrapa 48; *P. pachyrhizi* estudo 5 amostras de folha de Embrapa 48 (96-168hai)/mock-inoculada; *P. pachyrhizi*/ mock inoculada amostras de folha de (5601t)⁷.

⁴ <https://www.genevestigator.com/gv/>

⁵ http://www.plexdb.org/modules/PD_browse/experiment_browser.php?experiment=GM36

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE8432>

⁷ : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE33>

d) *Aphis glycines* x soja (V3): Análise da resposta transcricional de plantas de soja à infestação de pulgões de soja resistentes e suscetíveis. Experimento com três fatores: variedade de soja em V3 (suscetível SD01-76R, resistente LD05-16060), o tratamento de pulgões (controle, pulgões), e duração de infestação (1 dia e 7 dias)⁸.

e) *Heterodera glycines*: Análise de perfis de transcrição de raízes de soja (Williams 82), via microarranjo em três pontos de tempo de infecção (2,5,10 dias após inóculo - dpi) com nematódeos císticos de soja⁹.

f) *Phytophthora sojae*: Identificação de genes diferencialmente expressos durante infecção pelo patógeno *P. sojae* em 8 cultivares de soja que diferem na resistência quantitativa (Athrow, Conrad, General, Ox20-8, PI291327, Sloan, V71-370, Williams), através de microarranjo. As análises foram realizadas em tempos: 3dpi e 5dpi. Dados disponíveis em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7124>; Padrões de expressão em diferentes tempos, durante a infecção por *P. sojae* (isolado PT2004C2.S1), de cultivares de soja que diferem na resistência quantitativa (resistentes a cepa – CONRAD e V71-370, suscetíveis – SLOAN e VP-RIL9): estudos (3) (24hpi), (4) (48hpi), (5) (72hpi), (6) (120hpi)¹⁰, e estudos (7)(24hpi), (8) (48hpi), (9) (72hpi)¹¹. Estudo 10 – Amostras de hipocótilo de soja Harosoy (suscetível) inoculados com a cepa P6497 (raça 2) de *P. sojae*, foram analisados através de microarranjo em 12 (a), 24 (b), 48 (c) horas após o inóculo (hpi). Todos os resultados foram obtidos a partir de ensaios com microarranjo.

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE35427>

⁹ <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/browse.html?keywords=%09+E-MEXP-808>

¹⁰ http://www.plexdb.org/modules/PD_browse/experiment_browser.php?experiment=GM3

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE11611>

5.7 Efeito da ação direta do COV (E,E) α - farneseno na infecção de ferrugem em soja

O experimento foi conduzido dentro de dessecadores (figura 10) para se ter controle local e impedir a liberação do composto, sendo utilizadas 6 repetições biológicas do genótipo Williams 82 (susceptível). Quando as plantas atingiram o estágio V1, foram inoculadas com uma suspensão de água destilada com 0,05% (v/v) de “Tween 20” (Uniqema), ajustada a uma concentração final de aproximadamente 10×10^4 esporos/mL. Foi utilizado um dessecador para cada tratamento, sendo: (T1) testemunha, (T2) aplicação de 17uL por dia de acetato de farnesio (densidade 914mg/uL) (controle positivo) e (T3) a aplicação de 3uL por dia do COV (E,E) α - farneseno (densidade 0,861 mg/uL). A aplicação dos compostos ocorreu diariamente, iniciando-se 24 horas após a inoculação, e se estendeu por 8 dias.

No momento da aplicação dos compostos todos os dessecadores foram abertos para que houvesse trocas gasosas e também para a secagem das tampas e laterais dos recipientes, devido às altas taxas de transpiração, para evitar umidade excessiva e proliferação de fungos e bactérias. Os dessecadores permaneceram em câmara fria 23°C (aproximadamente), com fotoperíodo de 16 horas escuro e, 8 horas claro durante todo o experimento.

O 1º trifólio (o inoculado) de cada uma das repetições biológicas foi avaliado no 13º dia após a inoculação, totalizando 18 folhas avaliadas por tratamento (dessecador). Em cada folha foram avaliadas pelo menos 9 lesões. Os seguintes parâmetros foram avaliados: severidade de infecção de acordo com escala de Godoy, (2005), com adaptações, número de urédias por lesão e número de urédias abertas por lesão. Através dos resultados, calcularam-se as médias aritméticas bem como o desvio padrão de todos os parâmetros, a fim de se obter a representação em gráficos.



Figura 10. Imagem dos dessecadores utilizados para análise do efeito do composto acetato de farnesil e (E, E) α -farneseno em folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*.

5.7 Determinação de gliceolina

A detecção da fitoalexina gliceolina em folhas de soja mock-inoculada e inoculada com *P. pachyrhizi* foi determinada conforme descrito a seguir:

5.7.1 Amostra:

Foram utilizadas amostras de folhas de soja de plantas cultivadas em casa de vegetação e acondicionadas conforme descrito no item 5.1 até o momento da realização das análises.

5.7.2 Preparo das amostras:

Aproximadamente 100g de folhas frescas (mantidas a -80°C) foram liofilizadas para remoção total de umidade. Cada amostra foi então pesada e em seguida submetida ao processo de extração. Para tal, foi utilizado 5mL de metanol (MeOH 70%), seguido de agitação em – vórtex AP59 (Phoenix Luterco[®]) até completa homogeneização. As amostras foram, então, sonicadas (ultrasonic cleaner LS- Logen) durante 20 minutos, e mantidas (*over-night*) em temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram novamente homogeneizadas por agitação em vórtex e centrifugadas por 10 minutos a

10.000 rpm. O sobrenadante foi reservado e então submetido à filtração em filtro Millipore™ ($\varnothing=0,22\mu\text{m}$).

5.7.3 Separação e identificação do analito:

As amostras ultrafiltradas foram submetidas à análise por cromatografia líquida de fase reversa em associação com detector PDA e de massas Xevo Q-Tof UPLC -PDA/MS (Waters®) para separação, identificação e caracterização. As condições cromatográficas foram as seguintes: volume de injeção da amostra (10 μL), os componentes da fase móvel foram MeOH e H₂O ultrapura com o seguinte gradiente: 0-8 minutos H₂O/MeOH - 60:40, 8,5 minutos H₂O/MeOH - 56:44, 14,5 minutos H₂O/MeOH - 46:54, 15 minutos de MeOH 100%, 15,5-17 minutos H₂O/MeOH - 60:40, e tempo de corrida de 17 minutos, com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹, foi utilizada coluna Acquity UPLC BEH C18, $\varnothing = 1.7 \mu\text{m}$, 2.1 mm X 50 mm. O gerenciamento, processamento e interpretação dos dados obtidos foram realizados com auxílio do software Masslynx V4.1.

A partir destes dados foram feitos os cálculos das médias e desvio padrão das áreas totais dos picos de gliceolina de cada amostra para obtenção dos gráficos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Perfil transcricional de genes envolvidos na produção de sesquiterpenoides voláteis após infecção com *P. pachyrhizi* – análises *in vivo*

A fim de verificar se a redução dos níveis de (E,E) α - farneseno é uma consequência direta da repressão da expressão dos genes envolvidos em sua biossíntese, seis genes codificantes de enzimas envolvidas na rota MVA, que culmina com a produção do precursor IPP, bem como a enzima E.C. 5.3.3.2 isopentenil-difosfato isomerase, envolvida na conversão de IPP em DMAPP, tiveram seus perfis de expressão determinados via RT-qPCR ao longo do ciclo infeccioso em genótipos de soja contendo diferentes genes Rpp (PI230970-Rpp2, PI459025-Rpp4 e PI200487-Rpp5) e um genótipo suscetível (W82). Adicionalmente, genes codificando as enzimas prenilases: E.C. 2.5.1.29 geranyl-2P sintase, E.C. 2.5.1.10 farnesil difosfato sintase, E.C. 2.5.1.1 dimetilalil transferase, E.C. 2.5.1.36 gliceolina sintase, responsáveis pela produção das unidades prenil difosfato GPP, FPP, GGPP e gliceolina, respectivamente, também foram avaliados nas mesmas condições, bem como o gene codificando a enzima da etapa final da que leva a produção de (E, E) α -farneseno, a E.C. 4.2.3.46 (E, E) α -farneseno sintase, também foram investigados. Os genes avaliados foram didaticamente divididos em genes da rota do MVA, prenilases e terpeno sintase conforme representado no fluxograma (figura 11). Os resultados do perfil de expressão de cada gene em cada tempo e genótipo podem ser observados na tabela 2. Adicionalmente, os níveis de expressão foram convertidos em escala calométrica na base log₂ e representados pelo Heat Map (figura 12).

Figura 11. Fluxograma dos genes analisados da rota do mevalonato e dos diferentes terpenos formados a partir de isopentenil difosfato (IPP) através da ação de prenilases, bem como, da terpeno sintase, destacados em vermelho.

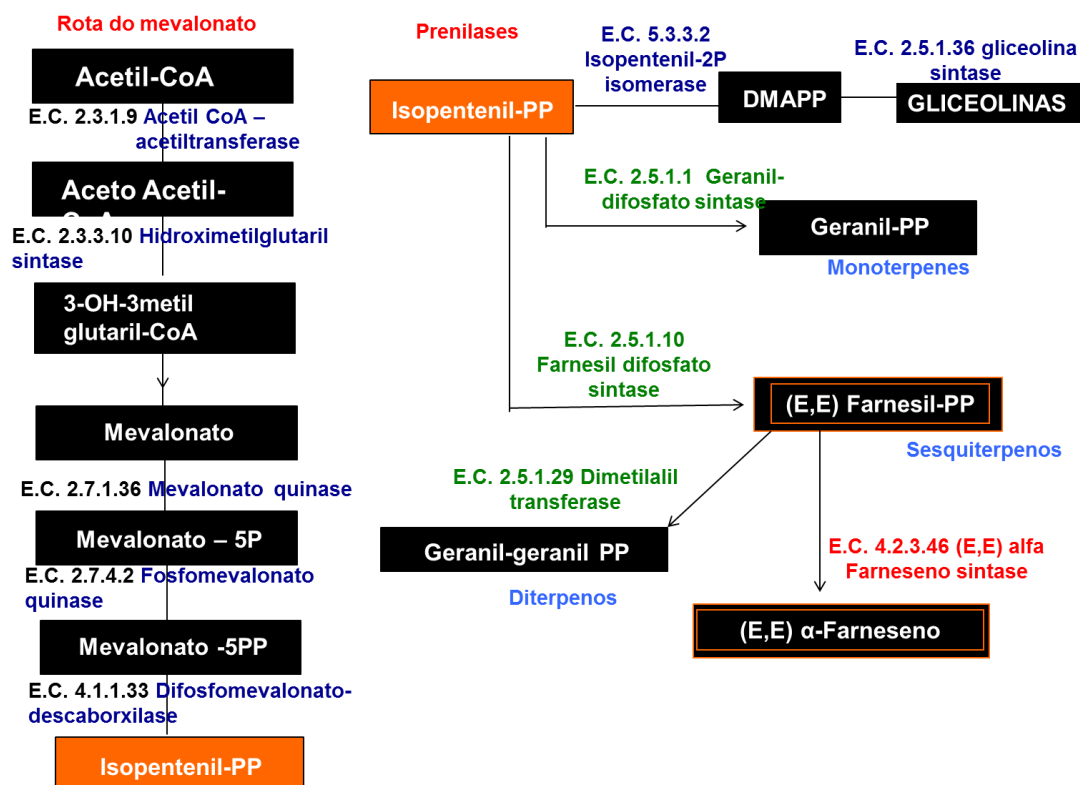


Tabela 2. Perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de Terpenoides e Gliceolina em soja após a infecção com *P. pachyrhizi*.

ID phytozome V.10	Genótipo	12 hai	24 hai	48 hai	72 hai	96 hai	192 hai
Glyma17g005300 E.C. 2.3.1.9 Acetil-CoA acetiltransferase	W82	0,867	0,865	1,601*	1,061	0,818*	1,632*
	Rpp2	0,803*	1,205	1,28*	1,138	0,729	1,497*
	Rpp4	1,331	1,225	1,035	0,884*	0,938	
	Rpp5	1,068	1,575	9,627	1,401*	0,997	2,225*
Glyma01g215500 E.C. 2.3.3.10 Hidroximetilglutaril-CoA sintase	W82	0,97	0,779	1,32*	0,487*	1,002	0,45*
	Rpp2	0,71*	0,482*	0,776	0,458*	0,495*	1,405
	Rpp4	0,953	0,477*	1,667*	1,199	0,602*	
	Rpp5	1,116	0,009*	0,165*	1,159	0,772	1,271
Glyma03g239000 E.C. 2.7.1.36 Mevalonato quinase	W82	1,158	0,619*	0,668	0,35*	0,7	1,329*
	Rpp2	0,559*	1,046	0,658	0,872	0,709*	0,547*
	Rpp4	0,657*	1,959	1,244	1,468*	1,002	
	Rpp5	0,70*	7,749	1,975	1,248	1,091	0,926

Os valores de expressão estão apresentados em log de base 2 dos valores de RQ (relative quantification) determinados pelo Software REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL et al., 2009). Legenda:

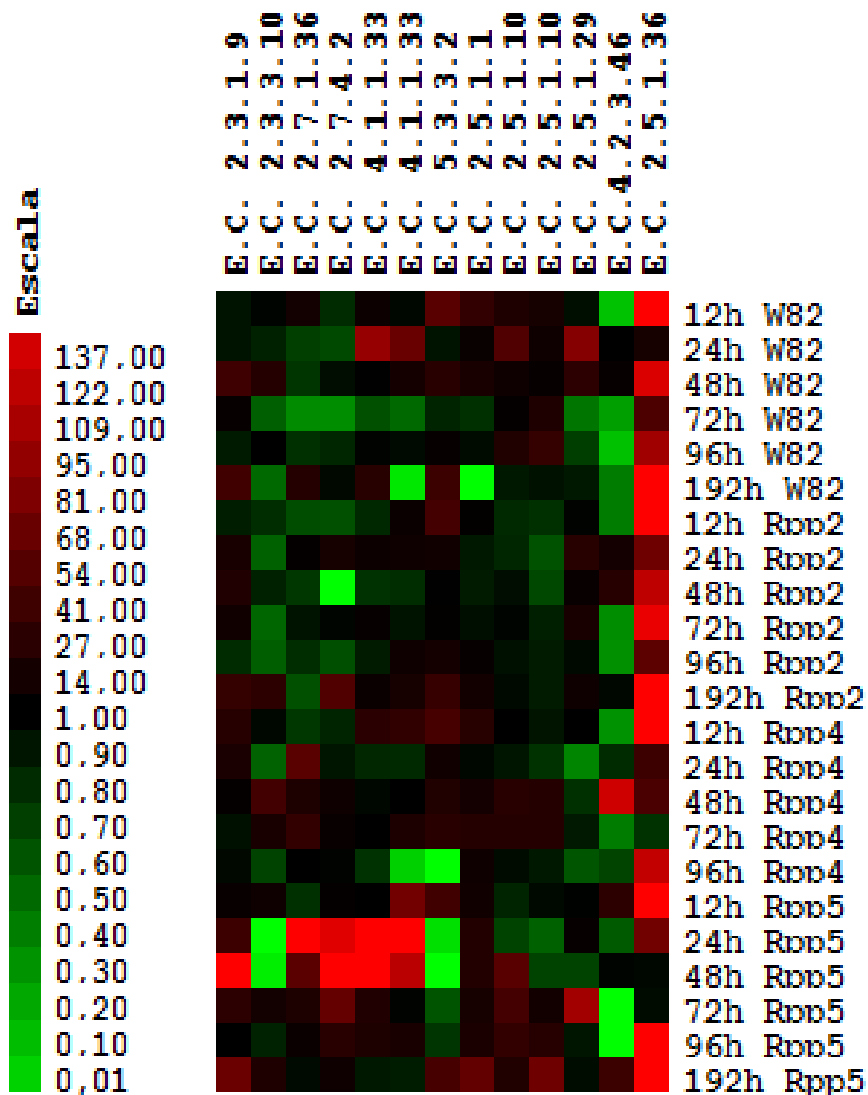
W82 refere-se à cultivar susceptível Williams 82, Rpp2 - PI 230970, Rpp4 - PI459025 e Rpp5 - PI200487

* valores significativos de expressão no nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de Terpenoides e Gliceolina em soja após a infecção com *P. pachyrhizi*. Continuação.

ID phytozome V.10	Genótipo	12 hai	24 hai	48 hai	72 hai	96 hai	192 hai
Glyma06g127200 E.C. 2.7.4.2 Fosfomevalonato quinase	W82	0,722*	0,574*	0,906	0,345*	0,751	0,936
	Rpp2	0,546*	1,182	0,07*	0,963	0,555*	1,84*
	Rpp4	0,761	0,849	1,127	1,07	0,972	
	Rpp5	1,04	5,418	79,77*	2,137*	1,369*	1,113
Glyma20g109900 E.C. 4.1.133 Difosfomevalonate decarboxilase	W82	0,954	2,201	1,173*	0,452	0,922	0,174*
	Rpp2	1,085	1,115	0,71	0,865	1,116	1,185
	Rpp4	1,442	0,731	0,997	1,236	0,209*	
	Rpp5	2,36*	6,786*	4,062*	0,977	1,206	0,809*
Glyma10g279800 E.C. 4.1.133 Difosfomevalonate decarboxilase	W82	1,106	3,098	0,99	0,546	0,976	1,344*
	Rpp2	0,735*	1,1	0,687	1,054	0,811	1,087
	Rpp4	1,378*	0,745	0,945	1,009	0,689*	
	Rpp5	1,014	11,057*	137,027*	1,279*	1,25	0,841
Glyma18g24230.1 E.C. 5.3.3.2 Isopentenil- difosfato Δ - isomerase	W82	1,942*	0,861	1,358	0,764	1,051	1,566*
	Rpp2	1,67*	1,139	0,992	1,027	1,175	1,508*
	Rpp4	1,717*	1,132	1,284	1,37*	0,028*	
	Rpp5	1,64*	0,185*	0,078*	0,53*	0,676*	1,713*
Glyma17g16600.1 E.C. 2.5.1.1 Geranil difosfato sintase	W82	1,465*	1,071	1,21	0,7*	0,917	0,042
	Rpp2	1,026*	0,833	0,814*	0,898	1,058	1,149
	Rpp4	1,345*	0,948	1,168	1,312	1,12	
	Rpp5	1,142	1,306*	1,294*	1,195	1,233	2,096*
Glyma09g01560.1 E.C. 2.5.1.10 (2E,6E)-farnesil difosfato sintase	W82	1,26*	1,833	1,122	1,038	1,287*	0,834
	Rpp2	0,733*	0,751	0,904	0,967	0,884	0,929
	Rpp4	1,015	0,853	1,361	1,328	0,914	
	Rpp5	0,758	0,6*	1,94*	1,68*	1,478	1,29*
Glyma15g12140.1 E.C. 2.5.1.10 (2E,6E)-farnesil difosfato sintase	W82	1,197	1,112	1,054	1,262*	1,497*	0,876
	Rpp2	0,694*	0,538*	0,579*	0,791*	0,815*	0,812*
	Rpp4	0,855	0,684*	1,316*	1,328*	0,84	
	Rpp5	0,929	0,48*	0,603	1,151	1,332	2,294*
Glyma11g06390.1 E.C. 2.5.1.29 Geranil-geranil difosfato sintase	W82	0,898	2,723	1,402*	0,411	0,627*	0,835
	Rpp2	0,973	1,351*	1,064	1,211	0,932	1,115
	Rpp4	1,006	0,366*	0,695*	0,827	0,52*	
	Rpp5	0,981	1,061	0,6*	3,403*	0,849*	0,909
Glyma13g321100 E.C. 4.2.3.46 α -farneseno sintase	W82	0,231*	0,999	1,05	0,302*	0,233*	0,39*
	Rpp2	0,389*	1,165	1,336	0,342*	0,337*	0,951
	Rpp4	0,332*	0,719*	4,76*	0,39*	0,598	
	Rpp5	1,407	0,502*	0,966	0,116	0,133*	1,559
Glyma10g29530.1 E.C. 2.5.1.36 Gliceolina sintase	W82	11,957*	1,194	5,158*	1,797	3,379*	11,72*
	Rpp2	12,758*	2,316*	4,23*	5,854*	2,009*	12,433*
	Rpp4	15,659*	1,593	1,753	0,685	4,352*	
	Rpp5	22,899*	2,349*	0,948	0,915	33,969*	21,426*

Figura 12. Perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de Terpenoides e Gliceolina em soja após a infecção com *P. pachyrhizi*.



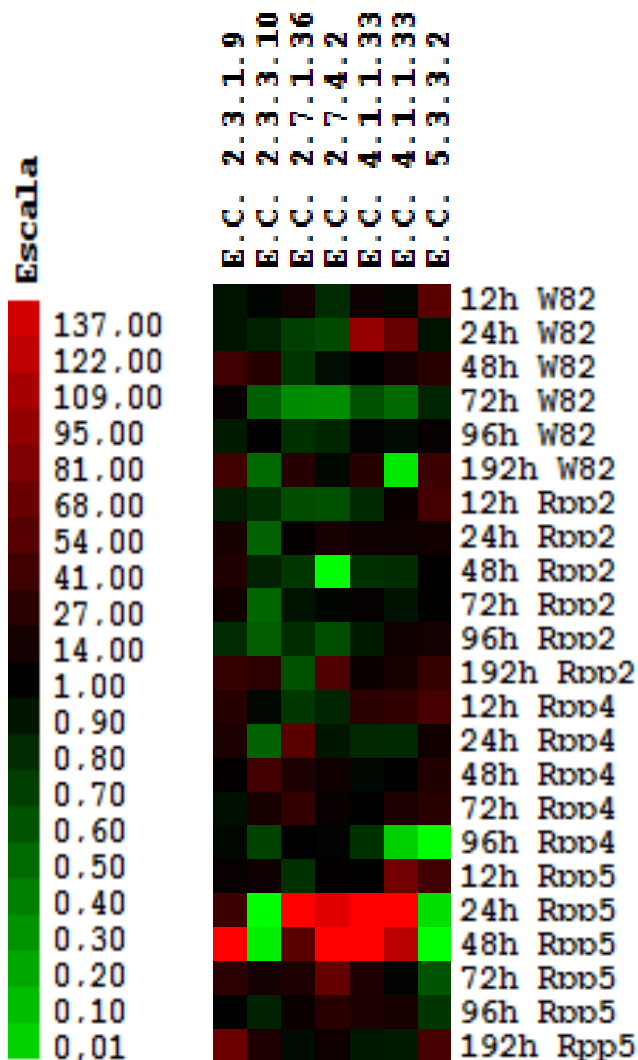
Os valores de expressão estão apresentados em log de base 2 dos valores de RQ (*relative quantification*) determinados pelo Software REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL *et al.*, 2009). Estes valores foram convertidos em escala colorimétrica pelos Softwares Cluster e Tree View. **Legenda:** W82 refere-se à cultivar susceptível Williams 82, Rpp2 resistente PI 230970, Rpp4 à PI459025 e Rpp5 que corresponde a PI200487. Enzimas: 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase; 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase; 2.7.1.36-mevalonato quinase; 2.7.4.2-fosfomevalonato quinase; 4.1.1.33-difosfomevalonato descarboxilase; 5.3.3.2-isopentenil-difosfato isomerase; 2.5.1.1-geranil difosfato sintase; 2.5.1.10-(2E,6E)-farnesil difosfato sintase; 2.5.1.29-geranil-geranil difosfato sintase; 4.2.3.46- α -farneseno sintase (GmTPs); 2.5.1.36-gliceolina sintase. A barra de escala de cores pode ser observada abaixo da figura, e compreende o intervalo entre os valores de *fold-change*.

6.1.1 Perfil transcricional de genes envolvidos na produção de IPP/DMAPP pela via do Mevalonato após a infecção por *P. pachyrhizi*

A rota MVA consiste de 6 reações enzimáticas iniciada pela condensação de 3 unidades de acetil-CoA, formando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que é reduzido a ácido mevalônico, seguindo por dois passos adicionais de fosforilação e decarboxilação culminando com a formação do produto final IPP, principal precursor na formação de terpenoides no citoplasma. O perfil de expressão de E.C. 2.3.1.9 acetil-CoA acetiltransferase, E.C. 2.3.3.10 hidroximetilglutaril-CoA sintase, E.C. 2.7.1.36 mevalonato quinase dos genes que codificam as enzimas E.C. 2.7.4.2 fosfomevalonato quinase e E.C. 4.1.1.33 difosfomevalonato decarboxilase, bem como da E.C. 5.3.3.2 isopentenil-difosfato isomerase, responsável pela interconversão de IPP/DMAPP foram medidos por RT-qPCR.

Em W82, o genótipo suscetível, a maioria dos genes que levam a produção de IPP foram reprimidos ou não diferencialmente expressos ao longo da rota, sendo possível observar uma discreta indução nos horários referente ao desenvolvimento haustorial (48 hai) para 3 genes (E.C. 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase, 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase e 4.1.1.33-difosfomevalonato descarboxilase) e em 192 hai, período correspondente à formação de urédias, onde 4 genes foram induzidos (E.C. 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase, 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase, 4.1.1.33-difosfomevalonato descarboxilase e 5.3.3.2-isopentenil-difosfato isomerase). Em contrapartida, uma forte repressão pode ser observada em 72 hai, onde 4 genes (E.C. 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase, 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase, 2.7.1.36-mevalonato quinase e 2.7.4.2-fosfomevalonato quinase) foram significativamente reprimidos e os demais não diferencialmente expressos, caracterizando assim uma resposta bifásica, com dois picos de indução intercalados por uma forte repressão da expressão gênica (tabela 2, figura 13).

Figura 13. Perfil de expressão dos genes envolvidos da rota do mevalonato após a infecção com *P. pachyrhizi*.



Os valores de expressão estão apresentados em log de base 2 dos valores de RQ (*relative quantification*) determinados pelo Software REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL et al., 2009). Estes valores foram convertidos em escala colorimétrica pelos Softwares Cluster e Tree View. **Legenda:** W82 refere-se à cultivar susceptível Williams 82, Rpp2 à cultivar resistente PI 230970, Rpp4 à PI459025 e Rpp5 que corresponde a PI200487. Enzimas: 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase; 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase; 2.7.1.36-mevalonato quinase; 2.7.4.2-fosfomevalonato quinase; 4.1.1.33-difosfomevalonato descarboxilase; 5.3.3.2-isopentenil-difosfato isomerase. A barra de escala de cores pode ser observada abaixo da figura, e compreende o intervalo entre os valores de *fold-change*.

Um tipo de expressão bifásica em resposta a ferrugem já foi reportada no genótipo Embrapa 48, quando da infecção com o fungo, sendo que neste genótipo foram observados dois picos de indução em 12 e 96 hai, diferente do genótipo resistente contendo o gene Rpp2, onde os picos de

expressão ocorreram em 12 e 72 hai. O segundo pico de indução da resposta de resistência, mais rápido no genótipo resistente e coincidindo com as fases de formação de haustório e consequente secreção de proteínas envolvidas na patogenicidade do fungo, foi indicado como crucial para o fenótipo de resistência (VAN DE MORTEL *et al* 2007). Ressalta-se, no entanto, que a resposta bifásica apresentada no trabalho de Mortel e seus colaboradores (2007), estava relacionada principalmente com a ativação de fatores de transcrição do tipo MYB e WRKY, regulando potencialmente as rotas de produção de fenilpropanoides e precursores de lignina. Tais rotas foram também ativadas nos genótipos Rpp3 e Rpp4 (SCHNEIDER *et al.*, 2011; MEYER *et al* 2009), sendo também descrita uma resposta do tipo bifásica em resposta ao fungo. Posteriormente, o envolvimento de tais rotas na resposta de resistência a ferrugem no genótipo Rpp2 foi validado funcionalmente, via ensaios de silenciamento transiente em soja (PANDEY *et al*, 2011). Desse modo, a produção de metabolitos secundários do tipo fenilpropanoides parece ser uma das principais respostas a infecção por *P. pachyrhizi* em soja, sendo mediada por diferentes genes de resistência. No entanto, com base nos resultados de expressão aqui apresentados, é possível que a produção de terpenoides também seja ativada em momentos específicos da infecção, contribuindo para a resposta basal da resistência.

Similar a W82, no genótipo Rpp4 também foi possível observar uma leve indução dos genes codificando 4 (E.C. 2.3.3.10-hidroximetilglutaril-CoA sintase, 2.7.1.36-mevalonato quinase, 4.1.1.33-difosfomevalonato descarboxilase e 5.3.3.2-isopentenil difosfato isomerase) das 6 enzimas avaliadas, neste caso em pontos específicos, não similar a uma resposta bifásica, no entanto, os genes foram reprimidos ou não diferencialmente expressos na maior parte dos pontos avaliados (tabela 2, figura 13). Ressalta-se que assim como em W82, a enzima 5.3.3.2 (isopentenil-difosfato isomerase) responsável pela reação reversível de IPP em DMAPP, foi induzida nos pontos iniciais avaliados, demonstrando que mesmo que haja uma baixa produção de IPP via rota MVA nestes genótipos, este pode ainda estar sendo convertido em DMAPP e, consequentemente, estar participando na produção

de outros terpenoides, como os mono e diterpenos, posteriormente demonstrado com base no perfil de expressão de diferentes prenilases avaliadas neste trabalho.

Diferentemente de Rpp4 e W82, o genótipo Rpp2 apresentou uma forte repressão de todos os genes avaliados na rota do MVA em resposta a *P. pachyrhizi*. Uma leve indução da rota foi apenas observada na primeira enzima da rota (E.C 2.3.1.9-acetil-CoA acetiltransferase) em 24 hai, ou no tempo final avaliado (192 hai). O perfil de expressão desta enzima também foi verificada por Tremblay *et al.* (2011) nos genótipos W82 e Rpp2, com forte indução em 48 hai, período crucial ao desenvolvimento do fungo, visto que há a liberação de proteínas efetoras que agem tentando sabotar os mecanismos de defesa da planta. Em todos os demais tempos analisados neste estudo, todos os genes foram significativamente reprimidos ou não diferencialmente expressos (tabela 2, figura 13). Conforme reportado por Brito Junior (2013), a produção do COV (E,E) α -farneseno foi reprimida após a infecção por *P. pachyrhizi* em soja, tanto em Embrapa 48, como no genótipo resistente, contendo o gene Rpp2. Embora IPP, o principal precursor da produção dos terpenoides sesquiterpenos, possa também ser produzido alternativamente pela via plastídica do MEP, pelo menos a rota MVA citoplasmática parece não estar envolvida na síntese deste importante precursor dos terpenoides, indicando a priori que a repressão da rota citoplasmática pode ser o agente causal da redução dos níveis do volátil no genótipo PI230970, portadora do gene Rpp2. Mesmo sendo observada uma forte down-regulação da rota do MVA, a indução de 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase), enzima que conecta as duas vias de produção de IPP, pode ser um indicativo do suprimento de IPP via rota plastídica MEP, podendo garantir o fornecimento dos precursores prenil para formação dos terpenoides.

A repressão das enzimas da rota do MVA apresentada nos genótipos W82, Rpp2 e 4 é condizente com o perfil de expressão observado na análise *in silico* visto que, a maior parte destes genes foram *down*-regulados nas diferentes interações planta-estresse (tabela 3, anexos). É possível que esta repressão verificada nestes genótipos seja uma maneira da planta de

concentrar gastos energéticos para garantir produção de gliceolina, fitoalexina de grande importância em reações de defesa do hospedeiro. Assim como neste trabalho, na análise *in silico* a enzima 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase) foi induzida em todos os tempos e estresses estudados, indicando a importância desta enzima nos mecanismos de defesa da planta.

No genótipo portador do gene de resistência Rpp5, diferentemente dos demais avaliados neste trabalho, a rota do MVA foi fortemente induzida ao longo do ciclo de colonização por *P. pachyrhizi*. Com exceção do gene codificando as enzimas E.C. 2.3.3.10 hidroximetilglutaril-CoA sintase, todos os demais genes envolvidos na produção de IPP foram fortemente up-regulados, principalmente nos tempos 24 e 48 hai, sendo que os níveis dos genes codificantes de E.C. 2.7.4.2 (fosfomevalonato quinase) e E.C. 4.1.1.33 (difosfomevalonato descarboxilase) atingiram os picos de 79,8 e 137 vezes mais induzidos nas amostras inoculadas comparadas às falso-inoculadas em 48 hai (tabela 2, figura 13). Interessantemente, nesses mesmos tempos, foi observada uma forte repressão de E.C. 5.3.3.2 (isopentenil-difosfato isomerase), sugerindo um possível acúmulo de IPP. Tal fato pode estar relacionado diretamente com o ciclo de desenvolvimento do fungo principalmente em 48 hai (haustório-proteínas efetoras), bem como, ser um indicativo da imediata percepção do fungo por este genótipo e da importância da síntese dos terpenoides na resposta de resistência mediada por Rpp5.

6.1.2 Perfil transcricional de genes codificando prenilases envolvidas na produção de terpenoides e gliceolina após a infecção por *P. pachyrhizi*

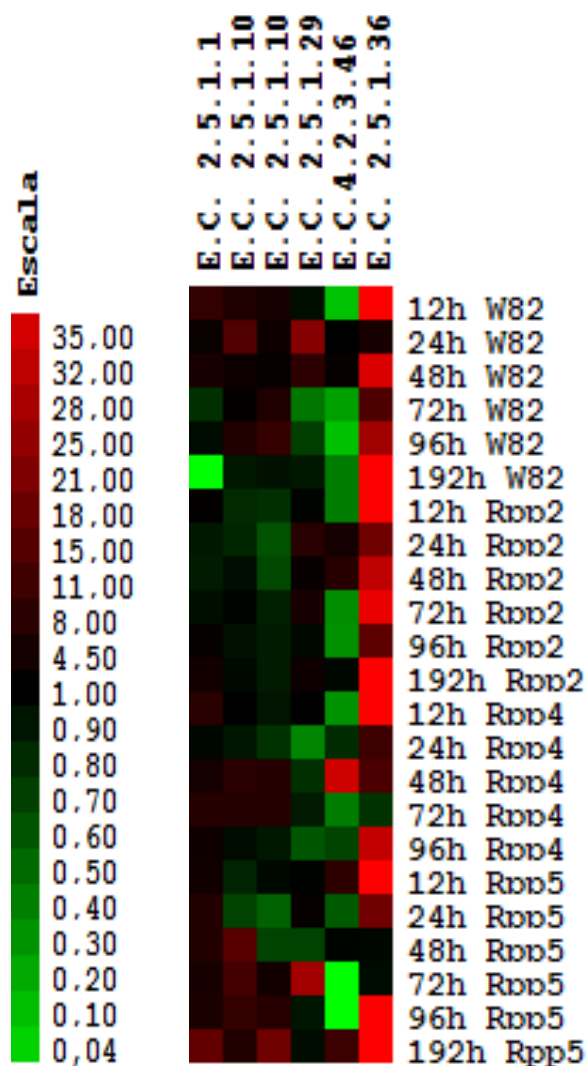
Os terpenoides constituem a maior e mais diversificada classe de metabólitos secundários, incluindo vários compostos voláteis, os quais são derivados de dois precursores comuns de 5 carbonos, IPP e DMAPP, que são produzidos pelas vias metabólicas MVA e MEP, sendo que IPP pode ser convertido reversivelmente em DMAPP pela ação da enzima E.C 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase). A partir de IPP e DMAPP, diferentes tipos de

terpenoides podem ser produzidos pela ação de preniltransferases, gerando os precursores prenil difosfato: geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranyl-geranyl difosfato (GGPP), que por sua vez são substratos para as terpenos ciclases, gerando os mais variados tipos de terpenoides (fluxograma-figura 10). Além das diferentes classes de terpenoides, DMAPP pode ainda ser utilizado como substrato e através da ação da prenilase E.C. 2.5.1.36 gliceolina sintase, contribuir para a formação de gliceolina, a mais importante fitoalexina em soja.

Ao menos uma das três prenilases relacionadas com a biossíntese das distintas classes de terpenoides (E.C. 2.5.1.1-geranyl difosfato sintase, E.C. 2.5.1.29-geranyl-geranyl difosfato sintase e E.C. 2.5.1.10-(2E, 6E)-farnesil difosfato sintase) foi induzida em soja após a interação com o fungo *P. pachyrhizi* nos diferentes genótipos analisados. A geranyl difosfato sintase (E.C. 2.5.1.1) foi up-regulada em todos os genótipos avaliados no tempo inicial após a infecção avaliado (12 hai), com exceção do genótipo contendo Rpp5, onde tal indução ocorreu a partir do momento em que a hifa de penetração alcança o meio intracelular (24 hai), se estendendo até o desenvolvimento haustorial (48 hai), e voltando a ser significativamente induzido em 192 hai, período correspondente à esporulação (tabela 2, figura 14).

No genótipo susceptível W82, todos os genes que correspondem as prenilases foram induzidos ao menos em um tempo avaliado, indicando que os terpenoides mono, di e sesquiterpenos podem ser relevantes ao desenvolvimento de mecanismos de defesa basais do hospedeiro infectado pela FAS. Observa-se no entanto que neste genótipo não houve indução da enzima farneseno sintase (GmTPS), ao invés, uma forte down-regulação desse gene pode ser observada (tabela 2, figura 14), sugerindo que não há produção deste composto em reações compatíveis, corroborando com o resultado obtido por Brito Júnior (2013) quando avaliou os níveis do volátil no genótipo suscetível Embrapa 48 após a infecção de ferrugem.

Figura 14. Perfil de expressão dos genes que codificam as prenilases envolvidas na produção dos terpenoides e gliceolina, e da enzima GmTPS, envolvida na produção do COV (E,E) α -farneseno após a infecção com *P. pachyrhizi*.



Os valores de expressão estão apresentados em log de base 2 dos valores de RQ (relative quantification) determinados pelo Software REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL et al., 2009). Estes valores foram convertidos em escala colorimétrica pelos Softwares Clustel e Tree View. **Legenda:** W82 refere-se à cultivar susceptível Williams 82, Rpp2 à cultivar resistente PI 230970, Rpp4 à PI459025 e Rpp5 que corresponde a cultivar PI200487. Enzimas: 2.5.1.1-geranil difosfato sintase; 2.5.1.10-(2E,6E)-farnesil difosfato sintase; 2.5.1.29-geranil-geranil difosfato sintase; 4.2.3.46- α -farneseno sintase (GmTPs); 2.5.1.36-gliceolina sintase.

No genótipo contendo o gene de resistência Rpp2, as enzimas geranil difosfato sintase (E.C. 2.5.1.1) e geranil-geranil difosfato sintase (E.C.

2.5.1.29) foram induzidas em pontos iniciais do desenvolvimento do fungo, 12 e 24 hai, respectivamente, mesmo após significativa repressão dos genes que codificam da rota MVA e, conseqüentemente dos níveis de IPP, sugerindo que seus precursores são potencialmente provenientes da rota MEP. A considerável repressão da (2E, 6E)-farnesil difosfato sintase (E.C. 2.5.1.10) em todos os tempos avaliados neste genótipo propõe que os mono e diterpenos estejam sendo gerados preferencialmente em relação a formação de (E,E), α -farneseno (figura 14). Tal fato pode estar relacionado com o direcionamento estratégico do gasto energético pela planta para a formação de outros compostos, mono e diterpenos, assim como gliceolinas, visto que esta última já possui precursores pré-formados, o que torna sua produção conveniente para o hospedeiro. Estes resultados de repressão e/ou a não regulação diferencial observada, também estão de acordo com Brito Júnior (2013), que relatou a possível repressão desta via do MVA com base na redução dos níveis deste volátil na soja infectada por *P. pachyrhizi*. Isto é consistente com o observado por Tremblay *et al* (2011) que também verificaram através de análises de microarranjo que a produção de FPP foi diretamente prejudicada após inoculação do fungo causador da ferrugem em soja.

Em Rpp4, observou-se a indução das prenilases envolvidas na formação do precursor FPP (E.C. 2.5.1.1-geranil difosfato sintase e 2.5.1.10-(2E,6E)-farnesil difosfato sintase), seguida de up-regulação da GmTPS (E.C. 4.2.1.46-alfa-farneseno sintase), indicando a possível produção de (E,E), α -farneseno pelo menos no ponto específico do desenvolvimento haustorial e secreção de proteínas efetoras (48 hai). Adicionalmente observou-se significativa repressão da E.C. 2.5.1.29 (geranil-geranil difosfato sintase), podendo indicar a “captura” do precursor FPP, favorecendo a produção dos sesquiterpenos ao invés dos diterpenos (tabela 2, figura 14). Esta indução da α -farneseno sintase (E.C. 4.2.1.46) também foi observada por Schneider *et al* (2008) no genótipo que continha o gene de resistência Rpp1 (PI200492) com dois diferentes isolados o HW94-1 e TW72-1 nas mesmas 48 hai, conforme tabela 3 (anexos). Neste genótipo Rpp4, observa-se que além da produção deste COV, ainda houve também a produção de gliceolina em todos os

períodos estudados conforme serão discutidos posteriormente, podendo estar relacionado com possíveis reações de defesa pela planta, afim de retardar o avanço da doença.

O perfil de expressão apresentado pelo genótipo Rpp5 foi distinto de todos os outros. Verificou-se forte indução dos genes que estão localizados no início da rota do MVA até a formação de IPP, principalmente nos períodos correspondentes ao desenvolvimento do apressório e invasão do meio intracelular da folha (12 e 24 hai), ao contrário da enzima 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase), que foi intensamente reprimida nos pontos intermediários, coincidindo com a indução das enzimas 2.5.1.1 (geranil difosfato sintase) e 2.5.1.10 ((2E,6E)-farnesil difosfato sintase), indicando que neste genótipo possa estar ocorrendo preferencialmente a síntese de mono e diterpenos. Tal fato pode estar relacionado com a tentativa do hospedeiro em reagir ao ataque patogênico através do reconhecimento específico do isolado do fungo utilizado no trabalho desde o início da interação entre eles.

A enzima gliceolina sintase (E.C 25.1.36), também denominada (-)-glicinol 4-dimetilaliltransferase (G4DT), foi intensamente induzida em quase todos os tempos e em todos os genótipos avaliados após a inoculação do fungo (tabela 2 e figura 14). A indução da gliceolina já foi reportada em soja em resposta a infecção por *P. pachyrhizi* (SCHNEIDER *et al*, 2008; VAN de MORTEL *et al*, 2011; WHITHAM *et al*, 2012), bem como em diferentes interações estudadas anteriormente, incluindo inoculação pela bactéria *B. japonicum* (LIBAUT *et al*, 2010) e oomicetos causadores da podridão radicular (ZHOU *et al*, 2008; GIJZEN *et al*, 2009). Tais resultados ratificam a importância desta fitoalexina nos mecanismos basais de defesa da planta (AKASHI *et al*, 2009).

Embora a G4DT tenha sido induzida em todos os genótipos e grande parte dos tempos avaliados após a infecção com o fungo, para sua formação faz-se necessária a geração do intermediário IPP, seguida de sua conversão em DMAPP pela enzima 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase). Tal precursor pode ser produzido tanto pela via do MVA como pela MEP, sendo que o fornecimento preferencial de DMAPP oriunda rota MEP para produção

de gliceolinas já foi reportado (AKASHI *et al.*, 2009). Desse modo, considerando ainda a baixa indução da via do MVA após a infecção em todos os genótipos avaliados, com exceção de Rpp5, pode-se inferir um improvável envolvimento da rota citoplasmática na geração dos precursores para biossíntese de gliceolina.

Apenas no genótipo Rpp5 foi possível observar uma expressiva indução da rota MVA, podendo gerar precursores para a ação das diferentes prenilases, incluindo a G4DT para a produção de gliceolina. Ressalta-se no entanto que neste genótipo também foi observada forte repressão da isopentenil difosfato isomerase (E.C. 5.3.3.2), o que indica baixa conversão de IPP em DMAPP, e conseqüentemente, um provável impacto na produção do precursor DMAPP via rota MVA. Uma vez que altos níveis de expressão de G4DT foram observados neste genótipo, pode-se inferir que o provável suprimento de DMAPP para produção de gliceolinas tenha origem pela via MEP, ratificando os resultados de AKASHI *et al.*, 2009.

Nos demais genótipos avaliados a rota MVA foi reprimida, portanto, não houve produção de IPP através dela, em contrapartida verificou-se indução da enzima responsável pela conversão de IPP em DMAPP. Tal observação sugere que a produção deste precursor tenha sido realizada também pela via MEP, e que a partir disso tenha favorecido a formação de gliceolinas. Isto implicaria na redução de precursores necessários na biossíntese de terpenoides, visto que de acordo com a literatura o sentido da conversão mais comum é DMAPP em IPP, plastídeo-citosol, respectivamente (AKASHI *et al.*, 2009).

Com base nos resultados apresentados pelos diferentes genótipos avaliados é possível inferir que não houve produção da gliceolina a partir de precursores sintetizados pela via MVA, e sim pela via MEP.

6.1.3 Perfil transcricional da terpeno sintase envolvida na síntese de (E,E) α -Farneseno após a infecção por *P. pachyrhizi*

A expressão de COVs é dependente da ação das diferentes terpenos sintases presentes na planta e do estímulo sofrido por ela, bem como da concentração de GPP, FPP e GGPP produzidos pela MVA e MEP, que são utilizados como substrato podendo originar mono (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos). Esta conversão ocorre pela ação das terpenos sintases que são divididas em oito subfamílias TPS-a, TPS-b, TPS-C, TPS-d, TPS-e, TPS-f, TPS-g e TPS-h de acordo com a similaridade do aminoácido (ZHANG *et al* 2013). Uma mesma TPS é capaz de formar diferentes produtos, e isto está correlacionado com a habilidade da planta em regular a expressão desses genes aumentando a capacidade de defesa quando submetida ao estresse (MOREIRA 2010).

Em soja, pelo menos 30 genes presentes na família terpeno sintase foram identificadas a partir da predição das sequências gênicas, sendo apenas 0,03gene/Mb do genoma da soja ocupado por elas (ZHANG *et al* 2013). A enzima GmTPS (E,E) α -farneseno sintase (E.C. 4.2.3.46), analisada no presente estudo, atua na etapa final da produção do volátil α -farneseno (sesquiterpeno), a partir de FPP ou GGPP, que podem servir de substrato tanto para a formação dos sesquiterpenos como também dos monoterpenos.

No presente trabalho, a indução de GmTPS foi apenas observada no genótipo Rpp4, especificamente em 48hai (período relevante ao desenvolvimento haustorial), coincidindo com a indução da prenilase responsável pela síntese de seu precursor, o FPP (E.C. 2.5.1.10-(2E,6E)-farnesil difosfato sintase), indicando dessa forma a possível formação do (E,E) α -farneseno apenas neste genótipo. Em todos os demais genótipos, foi observada significativa repressão desta GmTPS. Esta indução em 48hai concorda com os resultados de Schneider *et al* (2008), que verificou up-regulação neste mesmo período em soja contendo o gene de resistência Rpp1 após infecção com diferentes isolados HW94-1 e TW72-1 de acordo com tabela 3 (anexos). Adicionalmente, a repressão observada da prenilase E.C. 2.5.1.29 (geranil-geranil difosfato sintase) indica uma possível estratégia da planta afim de, deter o precursor prenil FPP, e conseqüentemente limitar a síntese dos diterpenos em benefício da produção de sesquiterpenos em Rpp4.

De modo adverso, verificou-se forte repressão da prenilase 2.5.1.10 ((2E,6E)-farnesil difosfato sintase), seguido pela repressão da GmTPS em Rpp2, confirmando que neste genótipo os precursores gerados foram utilizados para a síntese dos diterpenos, e conseqüente redução do (E,E) α -farneseno, concordando novamente com o observado por Brito Júnior (2013). A down-regulação verificada na prenilase está de acordo com resultados apresentados em diferentes interações de soja e patógenos, conforme tabela 3 (anexos).

No genótipo susceptível (W82), embora tenha sido sintetizado o precursor FPP, verificou-se significativa repressão da GmTPS, sugerindo que neste genótipo o FPP foi utilizado como substrato para a produção de mono e diterpenos resultando na redução do volátil (E,E) α -farneseno. Este decréscimo também pode ser observado na soja em resposta à infecção com isolado PT2004C2.S1 de *P. sojae*, visto que nos períodos 24, 48 e 72 há esta GmTPS foi down-regulada (ZHOU *et al* 2008) de acordo com a tabela 3 (anexos).

A alteração na produção destes COVs, após uma diversidade de estresse, pode ser comprovada pela análise do perfil de expressão desta enzima contido no banco de dados do Genevestigator, onde verifica-se down-regulação em diferentes interações (tabela 3, anexos). A alteração da síntese destes voláteis também pode ser verificada no estudo realizado por Moreira (2010) em milho, após herbivoria por *Spodoptera frugiperda*. Neste estudo foi observado que o incremento destes COVs associados as defesas da planta foram proporcionais ao período de interação (quanto maior fosse o período maior era a produção). A partir disso, e considerando-se que no presente estudo não houve diferença significativa entre susceptível e resistente, pode-se supor que a produção e/ou redução deste composto (E,E) α -farneseno está relacionada com as defesas basais em plantas. Expandindo-se a compreensão sobre a coleção de genes envolvidos na biossíntese de terpenos aumenta-se a possibilidade de desenvolvimento de plantas capazes de emitir sinais químicos mais concentrados e detectáveis, afim de melhor entender os efeitos destes compostos nos diferentes tipos de interações que a planta possa ser acometida.

6.2 Perfil transcricional de genes da rota MVA em resposta estresse bióticos em soja – análise *in silico*

Com o propósito de inferir os possíveis papéis dos genes envolvidos na biossíntese dos terpenos pela via MVA nos mecanismos de defesa da soja em resposta à diferentes estresses bióticos em especial por *P. pachyrhizi*, os 13 genes selecionados para o estudo foram também analisados em bancos de dados de expressão de soja (tabela 3, anexos). A busca da expressão diferencial dos genes selecionados permitiu a identificação de 9 trabalhos onde ao menos uma destas enzimas foram diferencialmente expressas em pelo menos um tratamento em resposta aos diferentes patógenos, sendo pelo menos três trabalhos também avaliando a resposta em soja frente a infecção com *P. pachyrhizi* foram identificados (tabela 3, anexos).

Considerando os três experimentos em resposta a infecção por *P. pachyrhizi* (SCHNEIDER *et al.*, 2008, van de MORTEL *et al.*, 2011, WHITHAM *et al.*, 2012) verificou-se expressão diferencial de todos os genes avaliados em pelo menos um dos trabalhos nos genótipos Rpp1, Rpp3 e Rpp4, sendo reprimidas apenas as enzimas mevalonato quinase, fosfomevalonato quinase, (2E, 6E) farnesio difosfato sintase e geranyl difosfato sintase (E.C. 2.7.1.36, 2.7.4.2, 2.5.1.10 e 2.5.1.29), nos tempos analisados. De todas as expressões significativas contabilizadas do estudo, de acordo com a tabela 3 (anexos), 18,18% corresponde à FAS, independente da interação compatível ou incompatível ($p < 0,05$; Fold-change $\geq 1,0$; ratio $\geq 0,5$). Os níveis de expressão variaram de -95,14 (fold -change) Glyma01g42450 (E.C. 2.3.3.10 – hidroximetilglutaril-CoA sintase) a 34,66 (fold-change) Glyma17g05500 (E.C 4.2.3.46 – α -farneseno sintase).

Em estudos anteriores do patossistema soja-*P. pachyrhizi* alguns autores relataram a expressão diferencial de genes envolvidos na via dos fenilpropanóides. Estes são responsáveis pela produção das fitoalexinas, lignificação e produção de antioxidantes (CHOI *et al.*, 2008) que participam das respostas de defesa do hospedeiro.

O mesmo perfil de expressão apresentado por *P. pachyrhizi* também foi observado em soja em resposta ao fungo *P. sojae*, sendo verificada uma expressão diferencial para todos os 13 genes avaliados.

Adicionalmente pelos menos um dos genes avaliados foram também diferencialmente expressos em estudos anteriores realizados em soja quando infectada por *Pseudomonas syringae* e *Bradyrhizobium japonicum* (bactérias), *Phytophthora sojae* (oomiceto), *H. glycines* (nematoide), *Spodoptera litura* (lagarta) e pulgões (LIBAUT *et al*, 2010; TYLER *et al* 2007; ZHOU *et al* 2008; WANG e YU, 2014; STUDHAM *et al*, 2012) em especial a enzima acetil-coA sintase (E.C. 2.3.1.9) que foi induzida nos experimentos de soja infectada com *P. sojae* (STUDHAM e MACINTOSH, 2012; TYLER *et al*, 2007) e pulgões (ZHOU *et al*, 2008).

A expressão dos genes da via do MVA, bem como prenilases, gliceolina sintase e terpeno sintase observadas nestes diferentes patossistemas, sugere o reconhecimento não característico do patógeno, de acordo com o observado por Schneider e seus colaboradores (2011), que relataram que esta via MVA está associada aos mecanismos de defesa basais, mediada pelo reconhecimento inespecífico de patógenos.

Outra observação foi que as principais enzimas da rota MVA tiveram o mesmo perfil de expressão para a maior parte das interações, a exemplo a up-regulação de E.C. 5.3.3.2 e da 2.5.1.1 (isopentenil difosfato isomerase e geranil difosfato sintase, respectivamente), bem como a down-regulação para a enzima difosfomevalonato descarboxilase (E.C 4.1.1.33 - Glyma10g42630).

Apenas as enzimas E.C. 2.3.1.9 (acetil-CoA acetiltransferase), 4.1.1.33 (difosfomevalonato descaboxilase), 2.5.1.1 (geranil difosfato sintase), 2.5.1.10 ((2E, 6E)-farnesil difosfato sintase) e 2.5.1.29 (geranil-geranil difosfato sintase) foram diferencialmente expressos após o ataque de pulgões, totalizando cinco genes.

Com base nos resultados, foi possível ainda observar a indução de apenas um único gene dos 13 avaliados na interação com três estresses bióticos: o gene codificando a enzima 5.3.3.2 (isopentenil difosfato isomerase) na interação soja e o nematoide *H. glycines*, a enzima 2.5.1.36 (gliceolina

sintase) para interação soja-*B. japonicum* e a enzima 4.2.3.46 (α -farneseno sintase) para a relação soja-*S. litura*.

Os resultados apresentados indicam que tanto a indução como a down-regulação dos genes da rota citoplasmática MVA, das prenilases e da GmTPS, envolvidos na biossíntese de (E,E) α -farneseno, não é característica exclusiva da interação da soja com *P. pachyrhizi*, no entanto em nenhum dos experimentos identificados foi possível observar uma expressiva repressão de toda a rota como observado para o genótipo contendo o gene Rpp2 após a infecção com *P. pachyrhizi*.

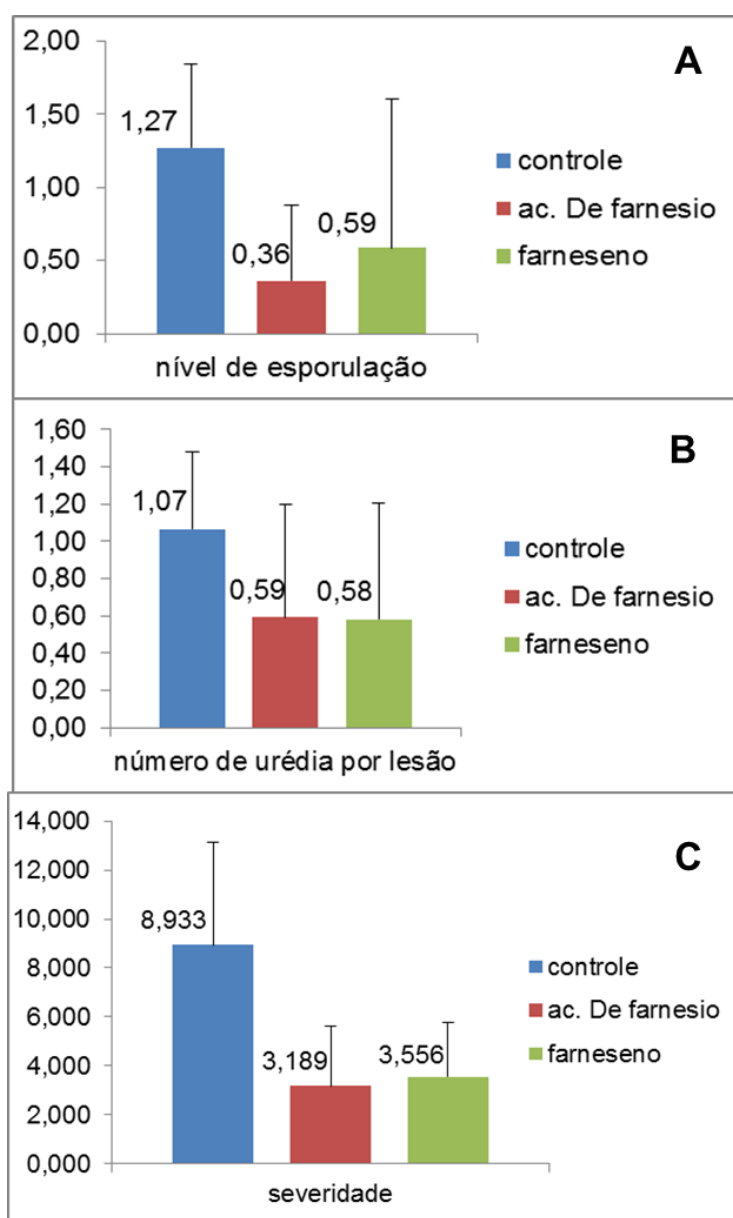
6.3 Efeito direto do composto acetato de farnesio e do COV (E, E) α -farneseno em folhas de soja infectada por *P. pachyrhizi*

Com base nos resultados, todos os parâmetros avaliados em resposta a infecção com *P. pachyrhizi* apresentaram uma leve redução tanto nas folhas tratadas com acetato de farnesio como com (E, E) α -farneseno quando comparado com o controle, embora tenha sido observada uma elevada variação nos dados obtidos.

As folhas controle tiveram o nível de esporulação equivalente a três vezes mais quando comparado com o acetato de farnesio e duas vezes maior que o COV (E, E) α -farneseno. Similarmente, o número de urédia por lesão nos trifólios que tiveram contato com os compostos não apresentou diferença significativa comparado ao controle, porém representou metade do observado quando comparado com o trifólio correspondente ao controle (figura 15 B).

O efeito dos compostos voláteis foi significativo apenas na redução dos níveis de severidade nas folhas tratadas comparadas com as controle (figura 15C), sendo que o controle teve níveis de severidade quase três vezes maior, quando comparado com as plantas tratadas com acetato de farnesio e (E, E) α -farneseno.

Figura 15. Efeito direto dos compostos acetato de farnesio e (E, E) α -farnesenona na infecção por *P. pachyrhizi* em folhas de soja susceptível Williams 82. (A) Representação do nível de esporulação do fungo *P. pachyrhizi*. (B) Representação do número de urédias por lesão de *P. pachyrhizi*. (C) Representação da severidade causada pelo fungo *P. pachyrhizi*. Com os valores obtidos calcularam-se as médias aritméticas e desvio padrão (representados pelas barras em cada coluna).



Apesar das quantidades disponibilizadas dos compostos acetato de farnesio (densidade 914 mg, aplicação de 17 μ L/dia correspondendo a 15,538 mg/dia) ser superior ao COV (E, E) α -farneseno (densidade 0,861, aplicação

3uL/dia correspondendo a 2,583 mg/dia), não se observou diferença significativa no desempenho dos compostos sobre todos os parâmetros analisados, sugerindo maior eficácia do COV na intervenção da colonização da planta pelo fungo.

A redução de todos os parâmetros analisados causados pelo contato direto com estes compostos corroboram com os resultados apresentados por Mendgen *et al* (2006), que também estudaram o efeito direto dos compostos decanal, nonanal, hexanal e acetato de farnesio na interação soja- *P. pachyrhizi*. Neste trabalho, os autores constataram que diferentemente dos demais compostos, o acetato de farnesio possuía efeito negativo no desenvolvimento haustorial, reduzindo-o em 48%, e quando este composto foi aplicado diretamente nas folhas com lanolina, causou também a redução de colônias em até 98%. Estes resultados demonstraram que este composto pode interferir na diferenciação celular do fungo, limitando a evolução da colonização do mesmo (MENDGEN *et al*, 2006).

Os dados obtidos no presente estudo, ainda são inconclusivos, novas abordagens devem ser adotadas para certificar a ação direta dos compostos no desenvolvimento do fungo, mas, a priori estes compostos demonstraram ter interferência no desenvolvimento de *P. pachyrhizi*.

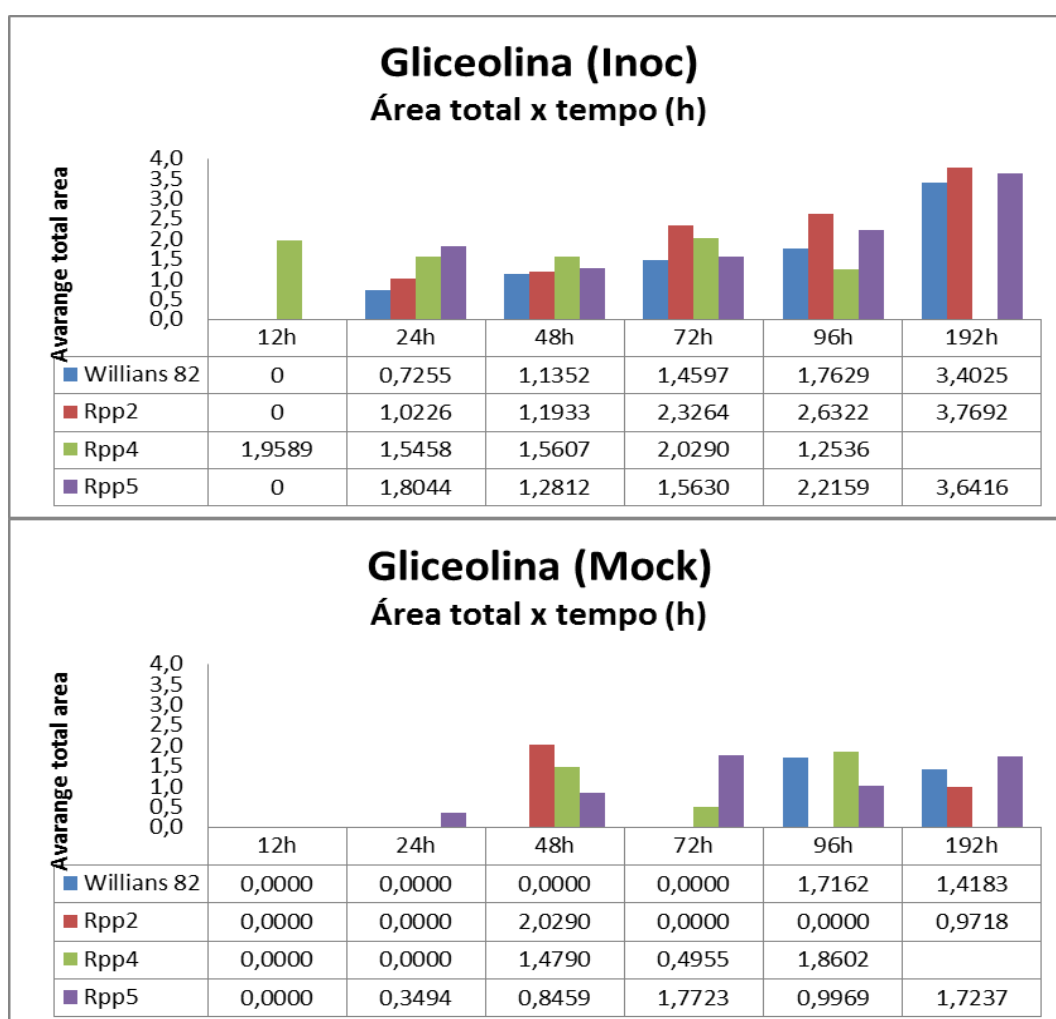
6.4 Determinação de gliceolina em folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*

A inoculação do fungo *P. pachyrhizi* em folhas de soja resultou no aumento da área do pico de gliceolina em todos os genótipos testados em comparação com o controle (mock-inoculados), sendo detectados a partir de 24hai, e culminando em aumentos consideráveis nas áreas dos picos de gliceolina ao final 192h. Neste caso, destacou-se o genótipo Rpp2, que apresentou uma área de 3,7692, como pode ser observado na figura 16A.

Não houve diferença considerável entre genótipos que continham genes de resistência e o genótipo suscetível, visto que o aumento da área do

pico desta fitoalexina ocorreu de forma semelhante em W82, Rpp2 e 5. Estes resultados estão de acordo com o observado por Lygin *et. al.* (2009), que também estudaram a interação neste mesmo patossistema e verificaram considerável acúmulo após 3 semanas de inoculação, especialmente nos genótipos resistente Rpp1, 2 e 3. Como previamente reportado por Lygin, os dados por eles obtidos corroboram com o presente estudo, onde também não se observou elevações relevantes de gliceolinas (em termos de área de pico) nas plantas falso inoculadas, em nenhum dos períodos analisados (figura 16B).

Figura 16. Representação das concentrações Gliceolina em folhas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e diferentes genótipos, Williams 82, PI 230970 (Rpp2), PI 459025 (Rpp4), PI 200487 (Rpp5) em 6 horários de avaliação 12, 24, 38, 72, 96, 192 hai. Os dados representam a média de três repetições de representantes do experimento inoculado (A) e representaçãodas média de três repetições de amostras do experimento falso-inoculado (B).



Diferentemente dos demais genótipos analisados, o Rpp4 já apresentou detecção de gliceolina desde o primeiro ponto de análise, as 12 hai, no entanto foi observado poucos incrementos no acúmulo da fitoalexina no decorrer do tempo após a inoculação com *P. pachyrhizi*. Em contrapartida, interessantemente apenas neste genótipo foi detectado a indução simultânea das enzimas E.C.2.5.1.10 (2E, 6E)-farnesil difosfato sintase e E.C. 4.2.3.46 (E, E) α -farneseno sintase, envolvidas na produção do sesquiterpeno α -farneseno (figura 14 e tabela 2).

A origem do precursor DMAPP como fonte de radicais prenil para formação de gliceolina nos plastídeos é decorrente da rota MEP (AKASHI *et al.*, 2009), onde o fluxo de carbono é maior, contribuindo com a biossíntese dos terpenoides no citosol (DUDAVERA *et al.*, 2013), sendo esta a principal rota de geração dos radicais IPP, comparado com a rota MVA. Desse modo, é possível especular que a elevada demanda do precursor DMAPP para biossíntese de gliceolina pela rota MEP pode comprometer o efluxo deste precursor no sentido plasto-citosol e de dessa forma comprometer a biossíntese de terpenoides, quando da infecção por *P. pachyrhizi*.

A produção de gliceolinas em folhas de soja não é uma resposta exclusiva apenas à infecção com o fungo *P. pachyrhizi*. Há relatos da produção desta fitoalexina em outros tipos de interações, bem como da indução do gene G4DT conforme observado nas interações da soja com *P. sojae*, *P. citricola* e *B. japonicum* (ZHOU *et al.*, 2008; GIJZEN *et al.*, 2009; SILVA, 2013 e LIBAUT *et al.*, 2010) (tabela 3). Silva (2013) constatou produção de gliceolina após indução com metabólitos de *P. sojae*, *P. citricola* em contato por 20 horas com cotilédones de soja, representando componentes principais para as respostas de defesa inata ou basais da planta.

Conforme resultados da análise de expressão gênica, elevados níveis do gene que codifica a enzima gliceolina sintase (E.C 2.5.1.36) (figura 14 e tabela 2), bem como daqueles envolvidos na produção do precursor DMAPP, foram detectados em plantas inoculadas em praticamente todos os períodos e genótipos estudados desde as horas iniciais de infecção, corroborando com os elevados níveis do composto detectado em todos os genótipos após a

infecção. Entretanto, os maiores níveis de gliceolinas foram detectados apenas nos períodos tardios, sugerindo um possível controle a nível pós transcricional, como por exemplo, na sua estabilidade, transporte e maturação. Entretanto, pouco se sabe sobre estes fatores pós-transcricionais, permanecendo elusiva a relação entre a expressão gênica da enzima glicocolina sintase e a efetiva produção de gliceolinas.

Com base nos resultados de expressão gênica da prenilase gliceolina sintase, bem como, os elevados níveis de gliceolina observados nas plantas de soja após a infecção com *P. pachyrhizi*, pode-se afirmar que esta fitoalexina tem importante papel na resposta basal de resistência à infecção de *P. pachyrhizi* em soja, embora haja uma resposta mais lenta em relação a detecção e/ou elevação da proteína comparado com a indução dos níveis de mRNA.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados verificou-se que os genes envolvidos na biossíntese dos terpenoides foram diferencialmente expressos após a infecção por *P. pachyrhizi*. Visto que os genes relacionados com a formação do IPP a partir de via MVA foram reprimidos na maioria dos genótipos avaliados, novos estudos devem ser abordados a respeito do suprimento de IPP via MEP para a produção dos terpenoides.

O gene que atua na produção de gliceolinas foi induzido em folhas de soja após infecção por *P. pachyrhizi* em todos os genótipos, sendo assim, pode-se inferir que os elevados níveis de DMAPP necessários para a produção desta fitoalexinas podem interferir e até comprometer a biossíntese dos terpenoides, entretanto são necessários novos estudos afim, de esclarecer tal relação. Verificou-se a partir dos resultados deste trabalho que estes genes são inespecíficos, já que ocorre alteração na expressão deles em diferentes interações conforme análise *in silico*.

Os compostos, acetato de farnesio e (E, E) α -farneseno causaram uma leve redução nos parametros nível de esporulação e número de uredias abertas em folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi*, sendo possível observar um efeito negativo significativo apenas na severidade, entretanto, tais resultados ainda são inconclusivos, são necessárias novas abordagens a fim de explicar porque estes compostos são reduzidos na planta quando infectada pelo fungo, considerando-se sua contribuição no impedimento da colonização e do desenvolvimento do mesmo e como isso ocorre.

Entender com precisão todas as etapas das vias de defesa da planta após a percepção de diferentes estresses, bem como os efeitos destes compostos no fungo, é crucial para uma melhor compreensão e possível intervenção contra a FAS.

ANEXOS

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja.

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor	
Glyma17g00910 E.C. 2.3.1.9 Acetil-CoA sintase	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	6-12 hai	+	0,80	1,72	0,045	Schneider et al 2008	
		P. pachyrhizi (TW72-1)	6-12 hai	+	0,81	1,70	0,015		
		P. pachyrhizi (TW72-1)	48 hai	-	-1,04	-2,13	0,036		
	SD01-76R (S) e LD05-16060 (R)	Pulgões			+	1,02	2,02	0,008	Studham et al 2012
	PI459025B (Rpp4)	P. pachyrhizi (HW94-1)		12hai	-	-1,69	-3,47	0,006	Whitham et al 2012
				24hai	-	-2,92	-6,73	0,013	
				48hai	+	1,12	2,14	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,41	1,33	0,001	Zhou et al 2008	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,70	1,60	0,001		
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	+	0,44	1,37	0,001		
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,36	1,28	0,001		
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,65	1,53	0,001		
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	+	0,78	1,63	0,001		
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	+	1,76	3,53	0,002	Tyler et al, 2007	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	+	1,64	3,38	0,005		
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,82	1,81	0,007		
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,99	2,09	0,004		
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,10	2,27	0,007		
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,74	1,71	0,01		
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,67	1,59	0,004		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma01g42450 E.C. 2.3.3.10 Hidroximetilglutaril - CoA sintase	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	48 hai	+	1,99	3,7	0,027	Schneider et al 2008
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	48 hai	+	1,63	3,09	0,04	
	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	-	-0,92	-1,88	0,029	van de Mortel, et al 2011
	PI459025B (Rpp4)	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	-	-0,77	-1,71	0,004	Whitham, et al 2012
	PI291327	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,18	2,39	0,008	Tyler, et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,79	1,68	0,026	
	WILLIANS	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,80	1,76	0,016	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,37	-1,29	0,049	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,38	-2,64	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,59	-3,02	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,95	-1,89	0,018	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,25	-2,29	0,006	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,51	-1,40	0,029	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	1,29	2,48	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	1,00	1,95	0,001	Zhou, et al 2008
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,72	-1,61	0,002	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	1,15	2,19	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,71	1,73	0,003	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,19	-2,14	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,44	2,7	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,64	1,6	0,002	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,96	-1,94	0,001	
	HAROSOY			12hai	-	-1,86	-3,85	0,007
		P. sojae (strain P6497)	24hai	-	-3,86	-15,29	0,001	
			48hai	-	-6,53	-95,14	0,001	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma03g39890 E.C.2.7.1.36 Mevalonato quinase	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	72hai	-	-0,56	-1,48	0,019	van de Morte et al, 2011
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	72hai	-	-0,76	-1,74	0,036	Whitham et al, 2012
	OX20-8	P. sojae	72hai	+	0,48	1,39	0,009	Tyler et al, 2007
	PI291327	P. sojae	72hai	+	0,35	1,28	0,024	
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	0,59	1,51	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,38	-1,30	0,025	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	-	-0,47	-1,39	0,03	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,40	1,34	0,017	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,44	1,38	0,001	Zhou et al, 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,23	1,19	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,51	1,45	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,22	1,18	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,51	1,43	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,20	1,43	0,001	
	HAROSoy	P. sojae (strain P6497)	24hai	-	-2,03	-5,20	0,045	Gijzen et al, 2009
			48hai	-	-2,74	-5,20	0,002	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma06g13260 E.C. 2.7.4.2 Fosfomevalonato quinase	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	-	-0,27	-1,20	0,019	van de Morte et al, 2011
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	6-12hai	-	-0,42	-1,34	0,023	Schneider et al 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,42	-1,32	0,036	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,59	-1,52	0,004	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,71	-1,64	0,003	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,47	-1,38	0,025	Zhou et al, 2008
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,18	1,17	0,048	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	-	-0,17	-1,13	0,029	
SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,28	1,23	0,002		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma10g42630 E.C. 4.1.1.33 Difosfomevalonato descarboxilase	V71-370	P. sojae	72hai	-	-0,19	-1,14	0,034	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,69	-1,61	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,64	-1,56	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,37	-1,30	0,007	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,38	-1,30	0,001	Zhou et al, 2008
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48hai	-	-0,45	-1,37	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,39	-1,31	0,001	
	HAROSOY	P. sojae (strain P6497)	48hai	-	-0,99	-2,06	0,004	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma20g24400 E.C. 4.1.1.33 Difosfomevalonato descarboxilase	SD01-76R (susC)	pulgões	24hai	+	0,28	1,22	0,024	Studham et al, 2012
	PI200492 - KOMATA (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	48hai	+	0,72	1,63	0,037	Schneider et al, 2008
	CONRAD	P. sojae	72hai	+	0,50	1,42	0,006	Tyler et al, 2007
	OX20-8	P. sojae	72hai	+	0,87	1,83	0,001	
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	1,16	2,25	0,001	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,93	-1,92	0,001	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,88	-1,85	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,52	-1,43	0,013	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,77	-1,7	0,011	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,77	1,83	0,036	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,85	1,83	0,001	Zhou et al, 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,74	1,72	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,24	-1,21	0,033	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,90	1,87	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,60	1,58	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,36	-1,29	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,03	2,04	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,49	1,43	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,22	-1,17	0,018	
				12hai	-	-1,05	-2,07	0,001
HAROSoy	P. sojae (strain P6497)	24hai	-	-2,13	-4,94	0,001		
		48hai	-	-0,18	-1,13	0,001		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA18G47770 E.C. 5.3.3.2 Isopentenil difosfato isomerase	WILLIAMS 82	H. glycines	48hai	+	1,50	2,82	0,001	Ithal et al, 2007
	WILLIAMS 82	H. glycines	48hai	+	0,30	1,23	0,003	Ithal et al, 2006
	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	4,15	18,5	0,001	van de Mortel et al, 2011
	PI462312	P. pachyrhizi (TW80-2)	12hai	+	3,19	9,37	0,001	
	PI462312	P. pachyrhizi (TW80-2)	24hai	+	0,44	1,35	0,019	
	PI459025B (Rpp4)	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	2,81	6,87	0,001	Whitham et al, 2012
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	2,89	6,65	0,01	
	PI459025B (Rpp4)	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	+	1,89	2,26	0,008	
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	+	0,78	1,75	0,022	
	ATHOW	P. sojae	72hai	+	2,60	6,34	0,001	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae	72hai	+	3,26	9,5	0,001	
	GENERAL	P. sojae	72hai	+	2,80	7,04	0,001	
	OX20-8	P. sojae	72hai	+	3,09	8,52	0,001	
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	3,54	11,54	0,001	
	V71-370	P. sojae	72hai	+	2,99	7,89	0,001	
	WILLIAMS	P. sojae	72hai	+	2,57	5,91	0,001	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	2,17	4,56	0,001	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	1,85	3,59	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	1,80	3,52	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	2,21	4,86	0,001	
CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	3,03	8,76	0,001		
SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	3,03	8,46	0,001		
V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	2,32	5,41	0,001		
VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	2,68	6,41	0,001		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA18G47770 E.C. 5.3.3.2 Isopentenil difosfato isomerase	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	2,61	6,29	0,001	Zhou et al, 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	2,11	4,51	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	3,08	7,95	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	2,16	4,60	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	1,81	3,73	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	3,02	8,20	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	2,36	5,17	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,78	3,26	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	3,21	8,80	0,001	
	HAROSOY	P. sojae (strain P6497)	24hai	+	0,65	1,56	0,015	Gijzen et al, 2009
		48hai	-	-0,61	-1,51	0,028		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA17G18160 E.C. 2.5.1.1 Geranil difosfato sintase	SD01-76R (susc)	pulgões	24hai	+	0,23	1,18	0,044	Studham et al, 2012
	PI462312	P. pachyrhizi (TW80-2)	12hai	+	1,39	2,62	0,001	van de Mortel et al, 2011
	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	1,83	3,56	0,001	
	PI459025B (Rpp4)	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	1,55	2,93	0,001	Whitham et al 2012
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	1,59	2,97	0,002	
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	+	0,41	1,33	0,026	
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	+	0,89	1,88	0,036	Schneider et al 2008
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	48 hai	+	1,34	2,53	0,006	
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	48 hai	+	0,88	1,87	0,02	
	ATHOW	P. sojae	72hai	+	0,97	1,98	0,001	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae	72hai	+	0,98	1,96	0,001	
	GENERAL	P. sojae	72hai	+	1,09	2,12	0,001	
	OX20-8	P. sojae	72hai	+	1,39	2,63	0,001	
	PI291327	P. sojae	72hai	+	1,25	2,37	0,001	
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	1,31	2,47	0,001	
	V71-370	P. sojae	72hai	+	0,97	1,97	0,002	
	WILLIAMS	P. sojae	72hai	+	1,18	2,27	0,001	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,95	1,93	0,003	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,95	1,94	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,74	1,67	0,001	
VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,90	1,93	0,014		
CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,16	2,25	0,001		
SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,16	2,27	0,001		
V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,75	1,69	0,001		
VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,95	1,97	0,001		

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA17G18160 E.C. 2.5.1.1 Geranyl difosfato sintase	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,54	1,49	0,001	Zhou et al, 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,47	1,39	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,84	1,81	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,43	1,37	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,49	1,41	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,93	1,92	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,56	1,48	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,42	1,36	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	1,05	2,10	0,001	
HAROSOY	P. sojae (strain P6497)		48hai	-	-1,16	-2,32	0,018	Gijzen et al, 2009

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA15G12780 E.C.2.5.1.10 (2E, 6E)-farnesil difosfato sintase	SD01-76R (susc)	pulgões	24hai	+	0,56	1,46	0,023	Studham et al, 2012
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	6-12 hai	-	-1,04	-2,09	0,018	Schneider et al 2008
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	6-12 hai	-	-1,12	-2,24	0,008	
	WILLIAMS	P. sojae	72hai	-	-0,72	-1,66	0,045	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,32	-1,24	0,042	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,04	-2,09	0,031	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,13	-2,12	0,006	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,96	-1,89	0,011	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,24	-2,27	0,020	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,26	1,17	0,047	Zhou et al, 2008
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,4	1,29	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,56	-1,41	0,006	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,36	1,32	0,026	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,6	-1,49	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,38	1,27	0,001	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,59	-1,55	0,001	
	HAROSOY	P. sojae (strain P6497)	12hai	-	-1,2	-2,4	0,019	Gijzen et al, 2009
		24hai	-	-2,48	-5,49	0,007		
			48hai	-	-5,52	-47,52	0,001	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma11g06820 E.C. 2.5.1.29 Geranil-geranil difosfato sintase	LD05-16060	Pulgões	24hai	+	0,34	1,27	0,014	Studham et al, 2012
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (HW94-1)	6-12 hai	-	-1,34	-2,62	0,03	Schneider et al 2008
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	6-12 hai	-	-1,06	-2,18	0,048	
	CONRAD	P. sojae	72hai	+	0,38	1,3	0,001	Tyler et al, 2007
	GENERAL	P. sojae	72hai	+	0,34	1,25	0,04	
	PI291327	P. sojae	72hai	+	0,41	1,34	0,014	
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	0,83	1,76	0,001	
	WILLIAMS	P. sojae	72hai	+	0,48	1,4	0,002	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,34	-1,25	0,029	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,35	1,3	0,032	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,39	1,32	0,02	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,31	1,25	0,045	Zhou et al, 2008
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,47	1,38	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,39	1,31	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,46	1,39	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,19	1,15	0,003	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,47	1,4	0,001	
V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,18	1,14	0,001		
HAROSOY	P. sojae (strain P6497)	48hai	-	-0,85	-1,81	0,002	Gijzen et al, 2009	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
Glyma10g29530 E.C. 2.5.1.36 Gliceolina sintase	WILLIAMS 82	B. japonicum	6hai	+	0,75	1,66	0,006	Libaut et al, 2010
	PI462312	P. pachyrhizi (HW94-1)	24hai	+	0,17	1,12	0,034	van de Mortel et al, 2011
	PI462312	P. pachyrhizi (TW80-2)	24hai	+	0,29	1,22	0,001	
	WILLIAMS	P. pachyrhizi (HW94-1)	12hai	+	0,14	1,10	0,015	Whitham et al, 2012
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	48hai	+	0,39	1,31	0,02	Schneider et al, 2008
	PI200492 (Rpp1)	P. pachyrhizi (TW72-1)	96hai	-	-0,19	-1,14	0,001	
	OX20-8	P. sojae	72hai	-	-0,28	-1,21	0,042	Tyler et al, 2007
	SLOAN	P. sojae	72hai	+	0,25	1,19	0,009	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,42	-1,32	0,025	Tyler et al, 2007
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,59	-2,99	0,001	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,41	-2,54	0,002	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,83	-1,70	0,032	
	VP-RIL9	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-1,04	-2,02	0,01	
	CONRAD	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,50	-1,39	0,015	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,43	-1,36	0,003	
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,69	1,66	0,001	
	V71-370	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	+	0,50	1,41	0,001	Zhou et al, 2008
	SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	+	0,57	1,59	0,001	
SLOAN	P. sojae (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	+	0,72	1,69	0,001		
HAROSoy	P. sojae (strain P6497)	48hai	+	0,51	1,41	0,017	Gijzen et al, 2009	

Tabela 3. Caracterização transcricional de genes da rota do mevalonato em resposta a diferentes doenças em soja. Continuação

Gene	Genótipo	Estresse	Período	Expressão	log2-ratio	Fold-change	p-value	Autor
GLYMA17G05500 E.C. 4.2.3.46 α -farneseno sintase	PI459025B (Rpp4)	<i>P. pachyrhizi</i> (HW94-1)	72hai	+	1,71	3,20	0,008	Whitham et al, 2012
	WILLIAMS	<i>P. pachyrhizi</i> (HW94-1)	>200hai	-	-4,61	-22,4	0,004	
	PI200492 (Rpp1)	<i>P. pachyrhizi</i> (HW94-1)	6-12 hai	-	-1,71	-3,51	0,004	Schneider et al, 2008
	PI200492 (Rpp1)	<i>P. pachyrhizi</i> (TW72-1)	6-12 hai	-	-1,86	-3,99	0,001	
	PI200492 (Rpp1)	<i>P. pachyrhizi</i> (HW94-1)	48 hai	+	5,01	34,66	0,011	
	PI200492 (Rpp1)	<i>P. pachyrhizi</i> (TW72-1)	48 hai	+	3,28	12,55	0,038	
	V71-370	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,08	-1,06	0,041	Zhou et al, 2008
	VP-RIL9	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	24hai	-	-0,18	-1,13	0,001	
	SLOAN	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,1	-1,07	0,038	
	VP-RIL9	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	48 hai	-	-0,18	-1,13	0,001	
	SLOAN	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,12	-1,09	0,005	
	VP-RIL9	<i>P. sojae</i> (PT2004C2.S1)- Raiz	72hai	-	-0,17	-1,12	0,001	
	WANXIANBAIDONGDOU	<i>S. litura</i> (percevejo)	24-144hai	+	1,06	2,01	0,026	Wang et al, 2014

Genevestigator: Ensaio formado por plantas de soja (V3) PI462312 (Rpp3) em três tratamentos: com cepa virulenta de *P. pachyrhizi* (TW80-2), com cepas avirulentas (HW94-1) e controles (mock). As análises foram realizadas em 6 pontos: 12hpi, 24hpi, 72hpi, 144hpi, 216hpi, 288hpi. Dados do experimento disponíveis em: http://www.plexdb.org/modules/PD_browse/experiment_browser.php?experiment=GM36. Todos os demais dados foram obtidos através de consulta ao Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>), utilizando os seguintes parâmetros para a análise dos resultados: $p < 0,05$; $\text{ratio} \geq 0,5$; $\text{fold-change} \geq 1,0$. Gene IDs acompanhados de "*" representam os 69 modelos com indução na interação soja-FAS; - *P. sojae*; *H. glycines*; *S. litura*; *B. japonicum*. *Aphis glycines* x soja (V3): Análise da resposta transcricional de plantas de soja à infestação de pulgões de soja resistentes e suscetíveis. Experimento com três fatores: variedade de soja em V3 (suscetível SD01-76R, resistente LD05-16060), o tratamento de pulgões (controle, pulgões), e duração de infestação (1 dia e 7 dias). Dados disponíveis em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE35427>. *Heterodera glycines*: Análise de perfis de transcrição de raízes de soja (Williams 82), via microarranjo, em três pontos de tempo de infecção (2,5, 10 dias após inóculo - dpi) com nematódeos císticos de soja. Dados disponíveis em: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/browse.html?keywords=%09+E-MEXP-808>. *Phytophthora sojae*: Identificação de genes diferencialmente expressos durante infecção pelo patógeno *P. sojae* em 8 cultivares de soja que diferem na resistência quantitativa (Athow, Conrad, General, Ox20-8, PI291327, Sloan, V71-370, Williams), através de microarranjo. As análises foram realizadas em tempos: 3dpi e 5dpi. Dados disponíveis em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7124>; Padrões de expressão em diferentes tempos, durante a infecção por *P. sojae* (isolado PT2004C2.S1), de cultivares de soja que diferem na resistência quantitativa (resistentes a cepa - CONRAD e V71-370, suscetíveis - SLOAN e VP-RIL9): estudos (3) (24hpi), (4) (48hpi), (5) (72hpi), (6) (120hpi), disponível em: http://www.plexdb.org/modules/PD_browse/experiment_browser.php?experiment=GM3 e estudos (7) (24hpi), (8) (48hpi), (9) (72hpi), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE11611>. Estudo 10 - Amostras de hipocótilo de soja Harosoy (suscetível) inoculados com a cepa P6497 (raça 2) de *P. sojae*, foram analisados através de microarranjo em 12, 24, 48 horas após o inóculo (hpi). Todos os resultados foram obtidos a partir de ensaios com microarranjo.

8. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. The Netherlands:Academic, **Plant Pathology**, Amsterdam, 2005.

AKASHI, T.; SASAKI, K.; AOKI, T.; AYABE, S.; YAZAKI, K. Molecular Cloning and Characterization of a cDNA for Pterocarpan 4-Dimethylallyltransferase Catalyzing the Key Prenylation Step in the Biosynthesis of Glyceollin, a Soybean Phytoalexin. **Plant Physiology**, vol. 149, p. 683–693, 2009.

ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. Em: **Zambolim, L. (Org.)**. Ferrugem Asiática da Soja. Visconde do Rio Branco, MG, Suprema Gráfica e Editora. p. 37-59, 2006.

ARENDT, P., POLLIER, J.; CALLEWAERT, N.; GOOSSENS, A. Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. **The Plant Journal**. Doi: 10.1111/tpj.13138, 2016.

BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; VON DAHL, V. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. **Science Signalling**, v. 311, n. 5762, p. 812-815, 2006.

BEDENDO, I. P. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. Ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 872-880, 1993.

BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, G. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defence against insects. **Proc Natl Acad Sci USA** 97, p. 9329–9334, 2000.

BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R.D. HARTMAN, G. L.; MILES, M. R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 6, p.708-716, 2006.

BONDE, M.R., MELCHING, J.S. & BROMFIELD, K.R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v. 66, p. 1290-1294, 1976.

BRADLEY, D. J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C. J. Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a plant cell wall proline-rich protein: A novel, rapid defense response. **Cell**, n. 70, p. 21-30, 1992.

BRISSON, L. F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. **The Plant Cell**, v. 6, n. 12, p. 1703-1712, 1994.

BRITO JÚNIOR, S. L. Ferrugem Asiática: Identificação de um composto volátil associado ao patossistema hospedeiro (*Glycine max*) e o estudo da interação incompatível com *Phaseolus lunatus*. **Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2013.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254–255, 1980.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A.; SMART, L. E. Cis-Jasmone switches on plant defence against insects. **Pesticide Outlook** 14, p. 96–98, 2003.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, p.470-491, 1995.

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R.D.; HYTEN, D.L.; NELSON, R.L.; HARTMAN, G.L.; DIERS, B.W. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion type resistance to soybean rust. **Crop Science**, v.49, n.3 p. 783-790, 2009.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; & YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 5, p. 919-923, 2008.

CHIARANDA, H. S. Volatilização dos compostos Btex em ambientes subsuperficiais contaminados com gasolina e etanol: comparação entre concentrações medidas e simuladas. **Dissertação para obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2006.

CHOI, J. J.; ALKAROUF, N. W.; SCHNEIDER, K. T.; MATTHEWS, B. F.; FREDERICK, R. D. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional & Integrative Genomics**, n. 8, p. 341–359, 2008.

CLUSTER-Software copyright c Stanford University 1998-99 This manual was originally written by Michael Eisen. It is only partially complete and is a work in progress. The manual was updated in 2002 by Michiel de Hoon, University of Tokyo, Human Genome Center, 2002.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 1 - Safra 2015/16, n. 10 - **Décimo Levantamento, Brasília**, p. 1-85, jul. 2016.

COPOLOVICI, L.; NIINEMETS, U. Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance. **Plant Cell Environ**, v. 33, p. 1582–94, 2010.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T. C. J. In situ modification of herbivore-induced plant odors: A novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 739-753, 2005.

DARBEN, M. L. Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil. **Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de doutor**. Maringá-Pr, 2013.

De PINTO, M. C.; PARADISO, A.; LEONETTI, P.; Hydrogen peroxide nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal*, n. 48, p. 784-795, 2006.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603–608, 2007.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. Tansley review. **New Phytologist**, v. 198, p. 16–32, 2013.

DUDAVERA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHEL, M.; RHODES, D.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. O nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceeding of the National academy of Science**, v. 102, n. 3, p. 933-938, 2005.

EBEL, R. C.; MATTHEIS, J. P.; BUCHANAN, D. A. Drought stress of apple trees alters leaf emissions of volatile compounds. **Physiol. Plant**, n. 93, p.709–12, 2006.

EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 894-900, 2011.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DO PARANÁ- FAEP. Disponível em: <<http://www.sistemafaep.org.br/usda-previsao-de-elevacao-nos-estoques-finais-de-soja-201415.html>> Acesso em 08 de out. de 2014.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stage of soybean development. **Iowa State University. Special report 80**, Mar. 1981.

FERREIRA, M. C. Aplicações de fungicida para o controle da ferrugem asiática da soja e interações com diferentes arranjos espaciais da cultura. **Dissertação**

de Mestrado em Agronomia.Fitopatologia. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

GABAI, B. Remoção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por adsorção. 2000. 91f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; DE SOUZA KIIHL R.; HARADA, A.; HIROMOTO D. M.; VIEIRA, L. G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 117, p. 545–553, 2008.

GIJZEN.; DONG, S.; QUTOB, D.; TEDMAN-JONES, J.; KUFLU, K.; *et al.* The *Phytophthora sojae* avirulence locus *Avr3c* encodes a multi-copy RXLR effector with sequence polymorphisms among pathogen strains. **PLoS One**, n. 4(5), p. 5556, 2009. PMID: 19440541

GILL, N.; FINDLEY, S.; WALLING, G. J.; HANS, C.; MA, J.; DOYLE, J.; STACEY, G.; JACKSON, S. A. Molecular and Chromosomal Evidence for Allopolyploidy in Soybean. **Plant Physiology**, v. 151 n. 3, p. 1167-1174, 2009.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, n. 31, p. 063-068, 2006.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology** 11: 169-177, 2010.

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.6, n.2, p.70-78, 2011.

GRAUS, M.; SCHNITZLER, J. P.; HANSEL, A.; COJACARIU, C.; RENNENBERG, H. Transient release of oxygenated volatile organic compounds during light-dark transitions in grey poplar leaves. **Plant Physiol**, v. 125, p.1967–75, 2004.

HARTMAN, G. L.; HILL, C. B.; TWIZEYIMANA, M.; MILES, M.R.; BANDYOPADHYAY, R. Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 2011, v. 6, n. 025, 2011.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Planet Disease**, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; TSCHANZ, A. T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, v. 75, p. 596-600, 1991.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, n. 26, p. 1135–1136, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, n. 23, 237–239, 1983.

HEIL, M.; SILVA BUENO, J. C. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. **Proceedings of the National academy of Science**, v. 104, n. 13, p. 5467-5472, 2007.

HEIL, M.; KOST, C. Priming of indirect defences. **Ecology Letters**, Davis, v. 9, n. 7, p. 813-817, 2006.

HIDAYAT, O.O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v.1, p.9-22, 1977.

HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene ϵ -beta-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, n. 4, p. 997-1008, 2012.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the *Rpp1* locus that confers, 2007.

JANSEN, R. M.; WILDT, J.; KAPPERS, I. F.; BOUWMEESTER, H. J.; HOFSTEE, J. W.; VAN HENTEN, E. J. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 157-174, 2011.

JERKOVIC, I.; MASTELIC, J. Composition of free and glycosidically bound volatiles of *Mentha aquatica* L. **Croatia Chemica Acta** 74, p. 431–439, 2001.

JONES, J.D. e DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KASK, K.; KANNASTE, A.; NUNEMETS, U. Emission of volatile organic compounds as a signal of plant stress. **Institute of Agricultural and Environmental Sciences**, Estonian University of Life Sciences, 2013.

Kawashima, C. G.; *et al.* A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature biotechnology**, 2016. doi:10.1038/nbt.3554

KESSLER, D. et al. Petunia flowers solve the defence/apparency dilemma of pollinator attraction by deploying complex floral blends. **Ecology Letters**, Davis, v. 16, n. 3, p. 299-306, 2013.

KIM, K. S.; UNFRIED, J. R.; HYTEN, D. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; SONG, Q.; DIERS, B. W. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI561356 and SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 1339–1352, 2012.

KIM, Y. S.; PARK, S. J.; LEE, E. J.; CERBO, R. M.; LEE, S. M.; RYU, C. H.; KIM, G. S.; KIM, J. O.; HA, Y. L. Antibacterial compounds from Rose Bengal-sensitized photooxidation of b-caryophyllene. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 540–545. 2008.

LAUREN, A.D. F.; PETER, S. S. Role of Cereal Secondary Metabolites Involved in Mediating the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. **Metabolites**, 1, 64-78; doi:10.3390/metabo1010064, 2011.

LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual Review of biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, p. 46, 2010. (Embrapa Soja. **Documentos**, 319).

LE CLOIREC, P. Les composés organiques volatils dans l'environnement. Nantes: **Ecole de Mines de Nantes**, p. 734, 1998.

LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C. H2O2 from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. **Cell**, n. 79: p. 583-593, 1994.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 125, p. 133–142, 2012.

LIBAULT, M.; FARMER, A.; BRECHENMACHER, L.; DRNEVICH, J. *et al.* Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to Bradyrhizobium japonicum infection. **Plant Physiol**, n. 152(2), p. 541-52, 2010. PMID: 19933387

LINO, E. J. **Identificação e caracterização de transcritos relacionados a mecanismos de resistência à ferrugem asiática da soja**. 2011. Dissertação (mestrado – genética e biologia molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

LIU, J. Z.; BRAUN, E.; QIU, W.; SHI, Y. F.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; NAVARRE, D.; HILL, J. H.; WHITHAM, S. A. Positive and Negative Roles for

Soybean MPK6 in Regulating Defense Responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 27, No. 8, pp. 824–834, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(T)⁻(Delta Delta C) method. **Methods**, Bethesda, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LYGIN, V. A.; LI, S.; VITTAL, R.; WIDHOLM, J. M.; HARTMAN, G. L.; LOZOVAYA, V. V. The Importance of Phenolic Metabolism to Limit the Growth of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology** n. 99, p.1412-1420, 2009.

MAFFEI, M.E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles **South African Journal of Botany**, v.76, p. 612–631, 2010.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, ISSN 0103-8478, 2008.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 31, p. 951–956, 1980.

MEDEIROS M. A. et al. Incidência natural de parasitoides em ovos de percevejos encontrados na soja (Hemiptera: Pentatomidae) no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1431-1435, 1998.

MEDEIROS, M. A. et al. Parasitismo e predação em ovos de *Euschistus heros* (Fab) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 397-401, 1997.

MENDGEN, K.; WIRSEL, S. G.; JUX, A.; HOFFMANN, J.; BOLAND, W.; Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1353-1361, 2006.

MEYER, J. D. F.; SILVA, D. C. G.; YANG, C.; PEDLEY, K. F.; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J. H.; SHOEMAKER, R. C.; ABDELNOOR, R. V.; WHITHAM, S. A.; GRAHAM, M. A. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in Soybean. **Plant Physiology**, v. 150, p. 295–307, 2009.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, 47, p. 829-834, Mar.-Apr. 2007.

MORAES, M. C. B. et al. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.131, n. 2, p. 178-188, 2009.

MORALES, A. M. A. P.; O' ROURKE, J. A.; MORTEL, M. van de.; SCHEIDER, K. T.; BANCROFT, T. J.; BORÉM, A.; NELSON, R. T.; NETTLETON, D.; BAUM, T. J.; SHOEMAKER, R. C.; FREDERICK, R. D.; ABDELNOOR, R. V.; PEDLEY, K. F.; WHITHAM, S. A.; GRAHAM, M. A. Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the Rpp4-mediated Asian soybean rust resistance pathway. **Functional Plant Biology**, n. 40, p. 1029–1047, 2013.

MOREIRA, L. S.D. EXPRESSÃO GENICA E voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em milho, *Zea mays L.* (Poaceae). **Dissertação para obtenção de mestrado em entomologia**. ESALQ-SP, Piracicaba-SP, 2010.

NICOLINI, F.; REIS, E. M.; ZOLDAN, S. M.; DANELLI, A. L. D.; ZANATTA, M.; AVOZANI, A.; TONIN, R. B.; GARCÉS, F. R. Efeito da radiação solar na germinação de uredosporos da ferrugem da soja. **Tropical Plant Pathology**, 35 (Suplemento): S143 (Resumo), 2010.

NIST, N. Mass Spectral Search for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. **Office of the Standard Reference Data Base, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland**, 2005.

PANDEY, A. K.; YANG, C.; ZHANG, C.; GRAHAM, M. A.; HORSTMAN, H. D.; LEE, Y.; ZABOTINA, O. A.; HILL, J. H.; PEDLEY, K. F.; WHITHAM, S. A. Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, n. 24, p. 194–206, 2011.

PANSTRUGA, R.; DODDS, P.N. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science**, v. 324, p. 748–750 2009.

PANTHEE, D.R.; YUAN, J.S.; WRIGHT, D.L.; MAROIS, J.J.; MAILHOT, D.; STEWART JR, C.N. Gene expression analysis in soybean in response to the casual agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in a early growth stage. **Funct. Integr. Genomics**, v. 7, p. 291-301, Out. 2007.

PASSARDI, Filippo et al. Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation. **Planta**, v. 223, n. 5, p. 965-974, 2006.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. **Biol. Plant**, v. 44, p.481–87, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e. 36, 2009.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative

expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, Maio 2002.

PICKETT, J. A.; ARADOTTI, G. I.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; KHAN, Z. R.; MIDEGA, C. A. O.; SMART, L. E.; WOODCOCK, C. M. Aspects of insect chemical ecology: exploitation of reception and detection as tools for deception of pests and beneficial insects. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2012.

RAMOS, J. P.; DOMINGUES, L. S.; DEBONA, D.; FAVENA, D. D.; MANFIO, A.; LENZ, G.; BALARDIN, R. S. Arranjo populacional no manejo da ferrugem asiática da soja. **Tropical Plant Pathology** 34 (Suplemento): S178 (Resumo), 2009.

ROSSI, M.; *et al.* The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 9750-9754, 1998.

SABULAL, B.; DAN, M.; ANIL, J. J.; KURUP, R.; PRADEEP, N. S.; VALSAMMA, R. K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2469–2473, 2006.

SCHIRMER, W. N. Amostragem, análise e proposta de tratamento de compostos orgânicos voláteis (COV) e odorantes em estação de despejos industriais de refinaria de petróleo. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SCHNEIDER, K.T.; VAN DE MORTEL, M.; BANCROFT, T.J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R.T.; FREDERICK, R.D.; BAUM, T.J.; GRAHAM, M.A.; WHITHAM, S.A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlates with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**, 157:355–371, 2011.

SCHOONHOVEN, L. M.; van LOON, J. J.; DICKE, M.; **Insect-Plant Biology**, 2nd ed., Oxford University Press: Oxford, 2006.

SHAH, J. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 229-260, 2005.

SILVA, D. C.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 57–63, 2008.

SILVA, P. J. T. Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por filtrados de *Phytophthora spp.* **Trabalho de conclusão de curso** apresentado na graduação em tecnologia em biotecnologia, UFPR, Palotina-Pr, 2013.

SIMÕES, K. Caracterização do Elicificador do Fundo *Mucor ramosissimus* e Estudo da Supressão de Sua Atividade Indutora de Soja por Fragmentos de Polissacarídeos Pécticos. 101 f. **Tese** (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. Soybean rust. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul: APS Press, p. 25-26, 1999.

SINCLAIR, J.B., ed. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, v. 75, n.3, p.220-4, 1991.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: APS Press, p. 24-27, 1989.

SKELTON, A.; CAMERON, M.; PICKETT, J.; BIRKETT, M. Identification of Neryl formate as the Airborne Aggregation Pheromone for the American House Dust Mite and the European House Dust Mite (Acari: epidermoptidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 798-804, 2010.

STONE, C. L.; MCMAHON, M. B.; FORTIS, L. L.; NUNES, A.; SMYTHERS, G. W.; LUSTER, D. G.; FREDERICK, R. D. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrizi* appressoria. **BMC Genomics**, v.13, p. 269, 2012.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Res**, 2015. 43:D447-52.

TAMIRU, A.; BRUCE, T. J. A.; MIDEGA, C. A. O.; WOODCOCK, C. M.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; KHAN, Z. R. Oviposition induced volatile emissions from African smallholder farmers' maize varieties. **Journal of Chemical Ecology**, p. 1-4, 2012.

TECNOLOGIAS 2014. EMBRAPA - Sistemas de Produção16 - Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. **INFOTECA-E, ISSN 2176-2902 Outubro, 2013**, s.n. p.204-232, Londrina, 2014.

TREEVIEW-Java TreeView was written by Alok Saldanha at Stanford University; it can be downloaded from <http://jtreeview.sourceforge.net/>.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; LI, S.; ALKHAROUF, N. W.; MATTHEWS, B. F. Identification of genes expressed by *Phakopsora pachyrhizi*, the pathogen causing soybean rust, at a late stage of infection of susceptible soybean leaves. **Plant Pathology**, v. 61, p. 773–786, 2013.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N.W.; LI, S.; MATTHEWS B. F. Gene Expression in Leaves of Susceptible *Glycine max* during Infection with

Phakopsora pachyrhizi Using Next Generation Sequencing. **Sequencing**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N.W.; LI, S.; MATTHEWSB.F. Transcriptoma analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, p. 183-193, Set. 2010.

TREMBLAY, A.; LI, S.; SCHEFFLER, B. E.; MATTHEUS, B. F. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 6, p. 163-174, 2009.

VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J.C.; GRAHAM, M.A.; NETTLETON, D. DITTMAN, J.D.; NELSON, R.T.; GODOY, C.V.; ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA, Á.M. R.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **The American Phytopathological Society**, 20:(8)887–899, 2007.

WHITHAM S. A. et al 2012. Prediction of the in planta *P. pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Mol Plant Pathol**, 2016. doi: 10.1111/mpp.12405.

WILDT, J.; KOBEL, K.; SCHUH-THOMAS, G.; HEIDEN, A. C. Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants part II: emissions of saturated aldehydes. **J. Atmos. Chem**, v. 45, p.173–96, 2003.

YAMANAKA, N., YAMAOKA, Y., KATO, M., LEMOS, N. G., PASSIANOTTO, A. L. L., SANTOS, J. V. M., BENITEZ, E. R., ABDELNOOR, R. V., SOARES, R. M., SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology** v. 35, ed 3, p. 153-162, 2010.

YANG X.B.; TSCHANZ A.T.; DOWLER W.M.; WANG T.C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v.81, p.1420-1426, 1991.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES, JUNIOR, J.; Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-677, 2005.

YORINORI, J. T. Ferrugem da soja: ocorrência no Brasil e estratégias de manejo. Em: **Reis, E. M. (Ed.)**. Doenças na Cultura da Soja. Aldeia Norte, Passo Fundo. p. 77-84, 2004.

YORINORI, J. T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem" asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. **Embrapa Soja**, 2004.

YORINORI, J. T. P. W.; MOREL, R. D.; FREDERICK, L. M.; COSTAMILIAN, P. F. BERTAGNOLLI. Epidemia de ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002. **Fitopatologia Brasileira** 27 (Suplemento): S178 (Resumo) 2002.

ZAMBOLIM, L. Manejo Integrado da Ferrugem Asiática da Soja. Em: **Zambolim, L. (Org.)**. Ferrugem Asiática da Soja. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco. p. 73-98, 2006.

ZAMBOLIN, I. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa, MG: Suprema, 139 p, 2006.

ZHANG, M.; LIU, J.; LI K YU, D. Identification and Characterization of a Novel Monoterpene Synthase from Soybean Restricted to Neryl Diphosphate Precursor. **PLoS ONE** n. 8(10) e75972, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0075972

ZHOU, L.; MIDEROS, S. X.; BAO, L.; HANLON, R.; *et al.* Infection and genotype remodel the entire soybean transcriptome. **BMC Genomics** 2009.

PMID: 19171053, 2008.

The transcriptional profile of genes involved in the production of terpenes and glyceollins in response to biotic stresses in soybean

Talitta Regina Parmezan¹, Salvador Lima Brito Júnior², Kenia de Carvalho³, Moisés de Aquino⁵, Mike Birkett⁴, John Pickett^{4,6}, Estela de Oliveira Nunes⁵, Ricardo Vilela Abdelnor⁵, Clara Beatriz Hoffmann Campo⁵, Francismar Corrêa Marcelino Guimarães⁵

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Londrina State University, Londrina-Brazil

² GDM Genetic of Brazil, Londrina-Brazil

³ Department of Genetic and Molecular Biology, Londrina State University, Londrina-Brazil

⁴ Biological Chemistry and Crop Protection Department, Rothamsted Research, Harpenden-UK

⁵ Brazilian Agricultural Research Corporation – EMBRAPA Soja, Londrina-Brazil

⁶ Current Address: School of Chemistry, Cardiff University, Wales, UK

Francismar C. Marcelino-Guimarães

Author address: Rod. Carlos Strass, Postal Box 231, Warta, Londrina, Paraná, 86001-970, Brazil

E-mail: francismar.marcelino@embrapa.br

ABSTRACT

Terpenes represent a class of volatile organic compounds (VOCs) consisting of plant signaling molecules. Volatile production may be altered after biological stimuli, such as bacterial, fungal and insect infections, triggering plant defense responses. These VOCs originate from two independent pathways: the mevalonate and the methylerythritol phosphate pathways, which utilize dimethylallyl and isopentenyl diphosphates to form the terpenoidal precursors of glyceollins. *Phakopsora pachyrhizi* causes Asian soybean rust, limiting soybean production and resulting in losses of up to 80% if no control strategies are applied. By using a transcriptome database, we investigated the regulation of genes of the mevalonate pathway under different biotic stresses; followed by *in vivo* analysis of the impact of *P. pachyrhizi* infection on the expression profile of

genes involved in terpenoid and glyceollin biosynthesis in different *Rpp* backgrounds (*Rpp2*, 4 and 5), and across the infection cycle (12, 24, 48, 72, 96 and 192 hours after inoculation). In addition, plant extracts were evaluated by ultra-high pressure liquid chromatography (UPLC) to determine the glyceollin production in the same conditions. Fungal infection activated genes involved in terpene production were dependent on *Rpp* background, while glyceollin biosynthesis was induced in all genotypes evaluated.

Keywords: Rust, Glycine max, Terpenes and Glyceollin.

1. INTRODUCTION

Terpenes constitute the largest and most diversified class of secondary metabolites, including various volatile organic compounds (VOCs) formed from the combination of two or more isoprenyl units, with the molecular formula $(C_5H_8O_2)_n$. These compounds constitute one of the main signaling molecules in plants and are commonly produced in response to bacterial infection (HUANG *et al.*, 2012), fungi (MENDGEN *et al.*, 2006) and insects (PICKETT *et al.*, 2012; TAMIRU *et al.*, 2012). In addition, these plants signaling molecules may have a negative effect on fungal infection process (MENDGEN *et al.*, 2006). As signaling molecules, terpenes can operate by stimulating plant defense mechanisms, including those of its intact systemic parts, or even by stimulating recognition in nearby plants (BALDWIN *et al.*, 2006; HEIL and SILVA BUENO, 2007).

Terpene biosynthesis occurs in two independent pathways the methylerythritol phosphate (MEP) pathway, located in the plastid, and the mevalonate (MVA) pathway, located in the cytosol, although with some emerging exceptions and crossovers. The MVA pathway is responsible for the production of the precursors of various terpenes and specifically the sesquiterpenes from dimethylallyl diphosphate (DMAPP) and isopentenyl diphosphate (IPP), while the MEP pathway provides these precursors for the formation of volatile hemiterpenes, monoterpenes, diterpenes and isoprenes which are precursors for the prenylation step towards a variety of phytoalexins, such as glyceollin (AKASHI *et al.*, 2009).

Glyceollins are prenylated pterocarpan, regarded as the main of soybean phytoalexins and are important in the defense against phytopathogens (GOUVEA *et al.*, 2011). Glyceollins have antioxidant, antimicrobial, antinematode, and antifungal action. The two main precursors in glyceollin production are daidzein and DMAPP, derived from phenylpropanoids and the MEP pathway, respectively (AKASHI *et al.*, 2009). According to the authors, DMAPP provides the isoprenyl unit for the enzyme prenylase 4-dimethylallyl transferase (G4DT, E.C. 2.5.1.36), which catalyzes the addition of DMAPP to carbon C₂ or C₄ of the pterocarpan skeleton (glycinol). The contribution of the MVA pathway to glyceollin production occurs at the step catalyzed by isopentenyl diphosphate Δ -isomerase, which converts IPP into DMAPP, which can be transported from the cytoplasm to the chloroplast and elongate the pterocarpan skeleton formed from daidzein (LYGIN *et al.*, 2009).

Asian soybean rust (ASR) is a disease caused by the obligate biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow and P. Syd). Damage caused by rust in Brazil varies from 10% to 90% (SINCLAIR and HARTMAN, 1999; YORINORI *et al.*, 2005), depending on the developmental stage of the plant and the degree of severity of the infection (BEDENDO 1993). Seven main genes conferring resistance to ASR (R genes) have been identified: Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4, Rpp5, Rpp6 and Rpp7, and genetically mapped in the soybean genome (BROMFIELD and HARTWIG, 1980; MCLEAN and BYTH, 1980; HARTWIG and BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; HYTEN *et al.*, 2007; MONTEROS *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CHAKRABORTY *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; CHILDS *et al.*, 2018). However, the development of soybean cultivars with broad and durable resistance against *P. pachyrhizi* are yet to be described.

Recent studies have focused on identifying mechanisms of response to infection in genotypes, by using transcriptomic, metabolomic and functional genomic approaches. These processes, comprising different genes triggering resistance to *P. pachyrhizi* (*Rpp*), are shown to be related to metabolic pathways, and their products involved in defense mechanisms (CHOI *et al.* 2008; VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011; TREMBLAY *et al.* 2011; PANDEY *et al.* 2011; BRITO JÚNIOR, 2013; MORALES *et al.* 2013). Studies on the transcriptomic response of soybean to *P. pachyrhizi* infection identified differentially expressed genes from the MVA pathway, such as those encoding the enzymes diphosphomevalonate decarboxylase (CHOI *et al.* 2008), mevalonate kinase (TREMBLAY *et al.* 2010), acetyl-CoA

acetyltransferase and phosphomevalonate kinase (TREMBLAY *et al.* 2011), geranyl diphosphate synthase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (SCHNEIDER *et al.*, 2011). According to Mendgen *et al.* (2006), some of the effects of VOCs on *P. pachyrhizi* development in soybean (cv Erin) leaves were caused by the mixture of three volatiles (nonanal, decanal, and hexenyl acetate). This VOCs blend was able to promote development of the pathogen 24 hours after inoculation (hai). However, the terpenoid farnesyl acetate, when separately evaluated, negatively regulates haustorial development, by suppressing differentiation of the fungal cell, and reducing 98% of colony development. However, it is unknown whether this phenotype was caused by induction on soybean defense mechanisms by VOC or whether the compound itself has an antifungal effect (MENDGEN *et al.*, 2006).

Studies in soybeans have demonstrated that induction of glyceollin synthesis is a defense response under different types of stress (MAZARO *et al.* 2008; SILVA 2013; AKASHI *et al.* 2009; GOUVEA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014). Akashi *et al.* (2009) reported an induction of glyceollin production in soybean in response to *P. pachyrhizi* after one week of infection, associated with traditional pathway (MEP), involving the precursor daidzein and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), as well as the action of the G4DT enzyme. Naoumkina *et al.*, (2007) and Farag *et al.* (2008) suggested that the intermediate of phytoalexins, the isoflavones, as daidzein are stored as glycosides (daidzin), facilitating the rapid synthesis of the glyceollins following a pathogenic attack to legume plants. Lygin *et al.* (2009) also reported glyceollin accumulation when studying differences in phenolic metabolism during a three-week soybean-*P. pachyrhizi*

interaction. Additionally, they observed that, this phenomenon was mainly present in genotypes containing resistance genes.

In the present study, genes involved in the cytoplasmic pathway for IPP production and genes encoding different prenylases involved in the production of mono-, di-, and sesquiterpenes and glyceollin synthesis were evaluated regarding their response to different soybean pathogens by *in silico* analysis of transcriptome databases. Using RT-qPCR, the expression levels of these genes were also evaluated in response to *P. pachyrhizi* infection, using soybean genotypes containing different *Rpp* genes. These genotypes were also evaluated for glyceollin accumulation during the infection cycle. From these results, we find that while glyceollin production is a general metabolite activated in response to pathogen infection on soybean, including by *P. pachyrhizi*, the production of different classes of terpenoids was differentially regulated depending on the *Rpp* genes present in the soybean accessions. Additionally, the levels of the VOC (*E,E*)- α -farnesene were evaluated in the initial hours after *P. pachyrhizi* inoculation (12-68 hai) either in compatible (genotype Embrapa 48) or incompatible (PI 230970) interactions of the soybean with rust. The levels of this VOC were inversely proportional to the plant symptoms; namely, the more evident the infection success was, the lower the VOC production.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 *In silico analysis*

The involvement of genes from MVA pathway in soybean disease responses was assessed by examining their expression profiles during

pathogen infection, which are available in transcriptome databases. The gene models previously reported as differentially expressed in *P. pachyrhizi* studies were used as selection criteria when different gene models were available for same enzyme annotation (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011; MORALES *et al.*, 2013).

The *in silico* analyses were conducted using data from nine microarray experiments performed with pathogen-infected soybeans, available at Genevestigator¹². Data were available from experiments with the soybean pathogens *P. pachyrhizi*, and the oomycete *Phytophthora sojae* (TYLER, 2007; GIJZEN *et al.*, 2009), the soybean aphid *Aphis glycines* (STUDHAM and MACINTOSH, 2013), the nematode *Heterodera glycines* and the bacteria *Bradyrhizobium japonicum* (LIBAULT *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2009; WANG and YU, 2014). All experimental designs and conditions are available in Supplementary File 1. The *in silico* expression analysis enabled evaluation of the transcriptional profiles of genes from MVA pathway during different biotic stresses in soybean. Unexpressed gene models in at least one of the experimental conditions were excluded from further analysis.

Seven genes encoding to the enzymes of the cytoplasmic MVA pathway [acetyl-CoA acetyltransferase (E.C. 2.3.1.9), hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (E.C. 2.3.3.10), mevalonate kinase (E.C. 2.7.1.36), phosphomevalonate kinase (E.C. 2.7.4.2), diphosphomevalonate decarboxylase (E.C. 4.1.1.33), and isopentenyl-diphosphate Δ -isomerase (E.C. 5.3.3.2)] as well as four genes corresponding to the prenylases geranyl

³ <https://www.genevestigator.com/gv/>

diphosphate synthase (E.C. 2.5.1.1), (2E, 6E)-farnesyl-diphosphate synthetase (E.C. 2.5.1.10), and geranyl-geranyl diphosphate synthase (E.C. 2.5.1.29) were analyzed. Likewise, genes encoding the terpene synthase α -farnesene synthase (GmTPS) (E.C. 4.2.3.46) and glyceollin synthase (E.C. 2.5.1.36) were also considered.

2.2 *In vivo* analysis of genes involved in terpene and glyceollin production in soybean response to *P. pachyrhizi* infection

2.2.1 Experimental Design

Soybean seeds of the cv Williams 82 (susceptible) and the plant introductions (PIs) containing different Rpp genes (resistants) to *P. pachyrhizi*, respectively, were obtained from the Embrapa Soja Germplasm Bank and soaked for 3 days in sand. Each genotype contains a specific previously characterized resistance (R) gene [PI 230970 (Rpp2), PI459025 (Rpp4) and PI200487 (Rpp5)]. The plants were grown in a greenhouse under controlled conditions of temperature (22 ± 1 °C), humidity (>60%) and a photoperiod (12 h). After reaching V2 stage (FEHR and CAVINES, 1981), the soybean plants were sprayed with the pathogen. The experiment was carried out by a completely randomized design with three replicates, each one composed by three plants. The Williams 82 (susceptible) and resistant PI genotypes (PI230970, PI459025 and PI200487) were inoculated with isolated LUB55 (collected in Uberlandia – MG, Brazil, 2011), by manual spraying with a solution of water and 0.05% (v/v) Tween-20, and a final concentration of 5×10^4 *P.*

pachyrhizi urediniospores/ml⁻¹. Samples were also mock-inoculated with the same solution lacking fungus (control plants). The second trifoliolate from each plant was collected at 12, 24, 48, 72, 96 and 192 hours after inoculation (hai) and immediately transferred to liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.2.2 Plant RNA isolation

Each sample (100 mg per replicate) was separately ground with a pestle, mortar and liquid nitrogen. After, the samples were distributed into 1.5 mL microtubes and stored at -80 °C. Total RNA (~1 g) was isolated from *P. pachyrhizi*-infected or uninfected frozen leaves using an RNA extraction kit with TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Analysis to RNA quantifying and qualifying were performed with a Uniscience NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), at a wavelength of 230 nm, and via agarose gel electrophoresis, respectively. The RNA samples were treated with deoxyribonuclease I (Kit DNaseI, Invitrogen). The SuperScript™ III Kit (Invitrogen) was used to synthesize cDNA from treated RNA according to the manufacturer's instructions, and, after, samples were stored at -20 °C. Validation of cDNA quality was performed using PCR with primers designed to anneal to two different exons of the β -actin gene (forward, 5-CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG-3 and reverse, 5-GGAATCTCTCTGCCCAATTGTG-3), to avoid DNA contamination.

2.2.3 RT-qPCR

The expression profiles of the gene models involved in the biosynthesis of IPP (MVA pathway), terpenes and glyceollins during *P. pachyrhizi* infection were evaluated using RT-qPCR. The enzymes were selected using KEGG, and complete sequences of the gene models were obtained from Phytozome¹³ and used to design primers. Specific primers to each of the 13 gene models were designed using the software Primer3Plus¹⁴ and Vector NTI Advance™ (Invitrogen). The sequences of the primers are listed in Table 1. A schematic pathway composed of all the genes selected for the analysis is presented in Figure 1.

The cDNA samples were amplified with specific primers to each gene model at a final concentration of 0.1–0.5 µM using 1X Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen–Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The β-actin gene was used as an endogenous control. The $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ formula was employed to calculate the reaction efficiency and to adjust the final primer's concentration and the calibration curve was established based on the Ct and the log of the cDNA dilutions. All amplification reactions were performed in triplicate using the 7900 Real Time System Thermocycler (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

After initial steps at 50 °C for 2 min (UNG activity) and 95 °C for 10 min (activation of the AmpliTaq Gold polymerase), a two-step program of 95 °C

¹³ <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

¹⁴ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

for 15 s and 62 °C for 1 min was run for 40 cycles. Dissociation curves were obtained to guarantee the absence of nonspecific amplification. The data were collected in the log phase, and the results were analyzed with the Sequence Detection program (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The final relative quantification of each gene compared with the control was estimated considering the relative quantification (RQ) obtained in each biological replicate, as represented by each independent experiment, with three replicates each. Significant differences were defined based on estimates of the Relative Expression Software Tool (REST) version 2.0.7, with a significance level of 5%. Additionally, expression levels were converted to a log₂-based colorimetric scale and represented as a heatmap using the software Cluster and Tree View (software copyright Stanford University 1998-99 and <http://jtreeview.sourceforge.net>, respectively).

2.2.4 Glyceollin and (E,E) α -farnesene analysis

Aliquot portions of leaf samples from the RT-qPCR experiments were used for the analyses of glyceollin levels. Approximately 100 mg of fresh leaves were lyophilized and extracted with 5 mL of methanol (70% MeOH) using an AP59 vortex mixer (Phoenix Luterco®) until completely homogenized. After sonication (20 minute) (ultrasonic cleaner LS-Logen), the samples were centrifuged (10,000 rpm for 10 minutes) and filtered through a Millipore™ filter ($\varnothing = 0.22 \mu\text{m}$).

The ultrafiltered samples were analyzed by liquid chromatography with data photo diode array detector (UHPLC-PDA) and mass detection (Xevo

Q-ToF) (both devices manufactured by Waters®). Chromatographic reversed-phase conditions were performed as follows: a sample injection volume of 10 μL , a run time of 17 minutes, a flow rate of 0.3 mL min^{-1} , and a mobile phase composed by MeOH and ultrapure H_2O . The gradient flow was: 0-8 minutes [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} 60:40$], 8.5 minutes [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}; 56:44$], 14.5 minutes [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}; 46:54$], 15 minutes of [$\text{MeOH} 100\%$], 15.5-17 minutes, [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}; 60:40$]. An Acquity UPLC BEH C18 column ($\text{Ø} = 1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$) was used. Data were taken using Masslynx V4.1 software (Waters®).

Additionally, using leaf samples of Embrapa 48 and accession PI230970 of three-week-old were analyzed for identification of the Volatile Organic Compounds (VOC's). These plants were maintained in glass container (60 cm high x 15 cm internal diameter), opened at the bottom and with two collection openings, one lateral for air entry and one at the top (for outlet) to VOC acquisition according the standard procedure of WEBSTER *et al.* (2008). The samples were analyzed by Gas Chromatograph - GC (Agilent 6890). Conditions were performed as follows: The oven temperature was maintained at 30°C for 1 minute, and set at 5°C/minute to 150°C , and maintained for 0.1 minutes, and then 10°C/minute to 250°C . Four microliters (μL) of each eluted sample were injected into the GC. Data were analyzed using HP ChemStation software. The quantification of VOCs was performed by an external standardization quantification method using standard samples (SKELTON *et al.*, 2010). The Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis was performed using a fused silica capillary column (50 m x 0.32 mm thickness, $0.52 \mu\text{m}$ thick film, DB-1), connected to a temperature-controlled injector.

Ionization was by electron impact (70e V, temperature 250° C). Helium was the carrier gas. The oven temperature was maintained at 30° C for 5 minutes, and then set at 5° C per minute to 250° C. Identifications were made by comparing the spectra with the spectral mass database (NIST, 2005). All experiments and analyses were carried out at Rothamsted Research experimental unit, Harpenden – UK.

3. RESULTS

3.1 *In silico* analysis of genes involved in the biosynthesis of terpene and glyceollin precursors during pathogen infection

We conducted an *in silico* analysis of soybean public transcriptome data available for 13 model genes identified in the MVA pathway (Supplementary Table S3), aiming of inferring the possible roles those genes involved in the biosynthesis of terpenes by the MVA pathway in soybean defense mechanisms in response to different biotic stresses, in particular by *P. pachyrhizi*. The transcriptome analysis allowed the identification of nine studies, where at least one of 13 enzymes was differentially expressed, in at least one treatment in response to different pathogens, in at least three studies of soybean responses to infection with *P. pachyrhizi* (Supplementary Table S3).

Based on transcriptome data, the main enzymes of the MVA pathway had the same expression profile for most interactions. For example, upregulation of E.C. 5.3.3.2 and E.C. 2.5.1.1 and downregulation of E.C. 4.1.1.33 (Glyma.10g426300) were observed.

It was possible to observe a differential expression of all 13 evaluated genes in at least one of the experiments involving the genotypes

Rpp1, Rpp3 and Rpp4, with only a subset of the enzymes (E.C. 2.7.1.36, 2.7.4.2, 2.5.1.10 and 2.5.1.29) displaying repression in the periods analyzed. From all significant expression changes, around 18% correspond to the ASR and soybean interaction, independent of whether the interaction was compatible or incompatible ($p < 0.05$, fold-change ≥ 1.0 , ratio ≥ 0.5). The levels of expression (fold-change) ranged from -95.14 (Glyma01g42450, E.C. 2.3.3.10) to 34.66 (Glyma17g05500, E.C. 4.2.3.46). The differential expression of the genes encoding the enzymes mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase, (2E, 6E) farnesyl-diphosphate synthase and geranyl diphosphate synthase (E.C. 2.7.1.36, 2.7.4.2, 2.5.1.10 and 2.5.1.29) was detected in all three experiments involving soybean backgrounds containing the R genes Rpp1, Rpp3 and Rpp4. All significant expression changes are summarized in Table S3.

Some of the genes studied presented a similar expression profile under different pathogen infections, such as the induction of isopentenyl diphosphate isomerase and geranyl diphosphate synthase during infection with *H. glycines* (van de MORTEL *et al.*, 2007), *P. sojae* (TYLER, 2007), aphids (STUDHAM and MACINTOSH, 2013) and *P. pachyrhizi* (CHOI, *et al.*, 2008) and the repression of diphosphomevalonate decarboxylase during *P. sojae* infection (ZHOU *et al.*, 2009). In addition, the same gene expression levels were observed in soybeans after *P. pachyrhizi* and *P. sojae* infection, and differential expression was shown for all 13 evaluated genes.

3.2 Expression profiles of genes involved in the biosynthesis of terpene and glyceollin precursors during *P. pachyrhizi* infection

According to the RT-qPCR analysis, in the susceptible genotype Williams 82 (W82), most of the genes that participate in IPP production were repressed or not differentially expressed (Figure 2). Only the enzymes E.C. 2.3.1.9, 2.3.3.10 and 4.1.1.33 were induced specifically at 48 hai and 192 hai. In addition, E.C. 5.3.3.2 was induced at 12 and 192 hai. At 72 hai, there was already intense repression of the enzymes E.C. 2.3.1.9, 2.3.3.10, 2.7.1.36 and 2.7.4.2.

In the Rpp2 genotype, a slight induction of the enzyme E.C. 2.3.1.9 was observed, while the other genes were repressed or not differentially expressed, with the exception of the later induction of the enzyme E.C. 5.3.3.2. However, in the Rpp4 genotype, slight induction of E.C. 2.3.3.10, 2.7.1.36, 4.1.1.33 and 5.3.3.2 was observed at specific timepoints.

In the Rpp5 genotype, the pathway was strongly induced, except for the enzyme E.C. 2.3.3.10. The strongest induction was observed in the enzymes E.C. 2.7.4.2 and E.C. 4.1.1.33, which reached expression levels between 79.8 and 137 times more induced in inoculated samples compared to the false-inoculated samples at 48 hai. At the same timepoints, strong repression of E.C. 5.3.3.2 was observed.

3.3 Expression profile of prenylases involved in terpene and glyceollin biosynthesis in different soybean Rpp backgrounds

At least one of three prenylases related to the biosynthesis of terpenoid classes (E.C. 2.5.1.1, E.C. 2.5.1.29 and E.C. 2.5.1.10) was induced

after interaction with *P. pachyrhizi* in the different soybean genotypes. All results can be found in Figure 2 and Table Supplemental 2. At 12 hai, the enzyme E.C. 2.5.1.1 was upregulated in all genotypes, except in the Rpp5 genotype, where such induction occurred at 24 hai, extended to 48 hai, and was significantly induced at 192 hai.

In the susceptible W82 genotype, all prenylases were induced during at least one of the timepoints analyzed. In this genotype, induction of the enzyme α -farnesene synthase (GmTPS) was not observed; instead, a strong downregulation of this gene was observed.

In the Rpp2 genotype, the enzymes E.C. 2.5.1.1 and E.C. 2.5.1.29 were induced in 12 and 24 hai, respectively, even after significant repression of genes encoding MVA pathway enzymes and, consequently, of IPP levels. There was considerable repression of E.C. 2.5.1.10 at all evaluated timepoints.

The induction of prenylases involved in the formation of FPP precursors (E.C. 2.5.1.1 and E.C. 2.5.1.10) was observed in the Rpp4 genotype, followed by upregulation of GmTPS (E.C. 4.2.3.46), indicating possible production of (E, E) α -farnesene, at least at 48 hai. Significant repression of E.C. 2.5.1.29 was observed. In this genotype, it was observed that, in addition to the activation of the GmTPS involved in the production of this VOC, there was also induction of the E.C. 2.5.1.36 involved in the production of glyceollin at all timepoints studied.

The expression profile of the Rpp5 genotype was distinct from the other genotypes studied. There was strong induction of genes located at the beginning of the MVA pathway until the formation of IPP, mainly at 12 and 24

hai. This behavior is unlike the one of enzyme E.C. 5.3.3.2, which was intensely repressed in the intermediate timepoints, coinciding with the induction of enzymes E.C. 2.5.1.1 and E.C. 2.5.1.10.

The enzyme E.C. 2.5.1.36 was intensely induced at almost all timepoints and in all genotypes evaluated after inoculation with the fungus, indicating dramatic production of glyceollin during *P. pachyrhizi* infection. However, the GmTPS involved in the production of the sesquiterpene (E, E) α -farnesene (E.C. 4.2.3.46) was generally repressed after *P. pachyrhizi* infection, with the exception of the expression pattern observed in the Rpp4 background.

3.4 Glyceollin and (E,E) α -farnesene levels after *P. pachyrhizi* infection

Inoculation of soybean with the fungus *P. pachyrhizi* provided glyceollin peak area detection in all genotypes tested, starting at 24 hai but at this time, the susceptible genotype presented the lowest glyceollin level. In general, the accumulation of the phytoalexin was increasing across the infection cycle. At 192 hai, all genotypes present near the same levels of glyceollins, as revealed by the peak area (Figure 3).

Volatiles collection in soybean *P. pachyrhizi* inoculated was started 18 hours after inoculation (hai) and passed over 48 hours, totalizing 66 hai of process. It was observed that after soybean infection with *P. pachyrhizi* fungus, one of the VOCs emitted by the plant had its production reduced, compared to false inoculated plants in both resistant and susceptible genotypes (Figure 4).

Comparing the spectra obtained with the spectral mass database, the reduced compound was identified (over 70% probability) as the metabolite

(E, E) α -farnesene. A co-injection between the VOC solution (2 μ L) and the external standard (E, E) α -farnesene (2 μ L) allowed the confirmation of this compound. The peak obtained on the chromatogram was unique at the retention time corresponding to (E, E) α -farnesene.

The plants were also evaluated daily for presence or absence rust symptoms. Disease symptoms appeared around seventh day after inoculation (dai), indicating that volatiles obtaining period, although not corresponding to phenotypic alterations, is associated with alterations of plant genetic expression. After comparing the chromatographic profiles, no other compounds were associated with the presence of *P. pachyrhizi* in the infected leaves.

Phenotypic analysis showed that high level of disease symptoms was related to higher (E, E) α -farnesene reduction among infected plants (Table 2).

Tests performed with detached soybean leaves inoculated with FAS make it is impossible infer any direct effect of volatile (E, E) α -farnesene in *P. pachyrhizi* infectious process. Leaves developed disease symptoms around the seventh to eighth day after inoculation, characterized as TAN lesions in Embrapa 48 genotype and RB-type lesions in PI 230970 genotype, both in which solutions were added (E, E) α -farnesene as in used as control (leaf disks containing only hexane solvent). However, further testing needs to be performed, especially regarding an efficient dilution of the compound.

4 DISCUSSION

4.1 Genes involved in terpene and glyceollin biosynthesis are induced by different soybean pathogens

The activation of genes of the MVA pathway, prenylases, and glyceollin and terpene synthases in soybean (GmTPS) was observed in different soybean-pathogen interactions, corroborating that these pathways are broadly activated by biotic stress in soybean, as part of the basal resistance response. Production of these compounds may not require specific recognition by the pathogen. Schneider *et al.* (2011) reported an association between the MVA pathway and basal defense mechanisms, mediated by nonspecific recognition of pathogens.

Based on the transcriptome data available, none of the prenylases involved in the synthesis of mono-, di- and sesquiterpenes and glyceollin were demonstrated to be specifically activated by *P. pachyrhizi* infection. The data also did not reveal a pattern of activation or repression of a specific pathway in a specific pathosystem. We observed only five genes differentially expressed in response to a specific pathogen, including the enzymes acetyl-CoA acetyltransferase, diphosphomevalonate decarboxylase, geranyl diphosphate synthase, (2*E*,6*E*)-farnesyl diphosphate synthase and geranyl-geranyl diphosphate synthase in response to aphids. Similarly, acetyl-CoA synthase was specifically upregulated in experiments where soybeans were infected with *P. sojæ* (STUDHAM and MACINTOSH, 2013; TYLER, 2007) and aphids (ZHOU *et al.*, 2009).

The data also did not reveal a tendency for activation or repression of a specific pathway by a specific pathosystem. Additionally, none of the

experiments demonstrated a repression of MVA pathway genes or the other genes investigated.

4.2 The terpene and glyceollin biosynthesis is part of P. pachyrhizi defense response in soybean

The MVA pathway consists of six enzymatic reactions initiated by the condensation of three acetyl-CoA units, forming 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, which is reduced to mevalonic acid, followed by two additional steps of phosphorylation and decarboxylation, culminating with the formation of IPP, the main precursor for the formation of terpenoids in the cytoplasm. Six genes encoding to enzymes of the MVA pathway, culminated with the production of the IPP precursor. The enzyme isopentenyl diphosphate isomerase (IDI), which is related to the conversion of IPP to DMAPP were also analyzed by RT-qPCR to define their expression profiles throughout the infectious cycle of fungi in soybean genotypes containing different Rpp genes (Rpp2, Rpp4 and Rpp5) as well as in a susceptible genotype (W82).

Most genes in the susceptible W82 genotype leading to the production of IPP were either repressed or not differentially expressed, and it was possible to observe a discrete induction during haustorial development (48 hai) of three genes (acetyl-CoA acetyltransferase, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase and diphosphomevalonate decarboxylase). At 192 hai, which corresponds to the formation of uredia, four genes were induced (acetyl-CoA acetyltransferase, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, diphosphomevalonate decarboxylase and

isopentenyl diphosphate isomerase). However, strong repression was observed at 72 hai, where four genes (acetyl-CoA acetyltransferase, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase) were significantly repressed, and the other genes were not differentially expressed, which is characteristic of a biphasic response, with two induction peaks interspersed by a strong repression of gene expression (Figure 2, Table S2).

A type of biphasic expression pattern in response to rust had already been reported in the Embrapa 48 genotype, and in this genotype, two peaks of induction were observed at 12 and 96 hai, which differs from those found in the resistant Rpp2 genotype, where the expression peaks occurred at 12 and 72 hai. The second phase of induction of the resistance response was faster in the resistant genotype, coinciding with the stages of haustorium formation and consequent secretion of proteins involved in the pathogenicity of fungi and was indicated to be crucial to the resistance phenotype (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007). It should be noted, however, that the biphasic response presented in the study by Mortel and his collaborators (2007) was mainly related to activation of type MYB and WRKY transcription factors, potentially regulating the production of phenylpropanoids and lignin precursors. These pathways were also activated in the Rpp3 and Rpp4 genotypes (SCHNEIDER *et al.*, 2011; MEYER *et al.* 2009), and a biphasic response to fungus was also described. Subsequently, transient silencing in soybean (PANDEY *et al.*, 2011) functionally validated the involvement of such pathways in the resistance response to rust in the Rpp2 genotype. Thus, the production of phenylpropanoid secondary metabolites may

be one of the main responses to *P. pachyrhizi* infection in soybean, as it is mediated by different resistance genes. Considering the expression data obtained in this study, it is possible that terpene production activated at specific times during the infection, contributes to resistance response to *P. pachyrhizi*.

The Rpp4 genotype likewise W82, displayed a slight induction of four of the six MVA pathway genes evaluated (hydroxymethylglutaryl CoA synthase, mevalonate kinase, diphosphomevalonate decarboxylase and isopentenyl diphosphate isomerase) at specific timepoints. A biphasic response was not observed; however, the genes were repressed or not differentially expressed at most of timepoints (Figure 2, Table S2). It should be noted that, as in the W82 genotype, the enzyme isopentenyl diphosphate isomerase, responsible for the reversible reaction of IPP to DMAPP, was induced in the Rpp4 genotype at the initial timepoints. This shows that even with slight production of IPP by the MVA pathway in these genotypes, the IPP may still be converted into DMAPP and, consequently, may be involved in the production of other terpenoids, such as mono- and diterpenes, as demonstrated by the expression profile of different prenylases observed in this study.

Different from the Rpp4 and W82 genotypes, the Rpp2 genotype displayed strong repression of all MVA pathway genes evaluated in response to *P. pachyrhizi*. A slight induction was only observed in the first enzyme of the pathway (acetyl-CoA acetyltransferase) at 24 hai and at the final timepoint evaluated (192 hai). Tremblay et al. (2011) also verified the expression profile of this enzyme in the W82 and Rpp2 genotypes, with a strong induction at 48 hai, a crucial period for fungal development, when the pathogen has established

many haustoria in the apoplast and is secreting effector proteins to interrupt the defense mechanisms of the plant. At all other time-points analyzed in this study, all of the genes were significantly downregulated or were not differentially expressed (Figure 2, Supplementary Table 2). Repression of the MVA pathway in the Rpp2 genotype may compromise the production of IPP, the main precursor for sesquiterpene-terpenoid production in the cytoplasm. This result was validated by the evaluation of the VOC sesquiterpene (E, E) α -farnesene production. This sesquiterpene was repressed after *P. pachyrhizi* infection in both the susceptible Embrapa 48 genotype and a resistant genotype containing the Rpp2 gene (Table 2).

Alternatively, IPP can also be produced by the plastidial MEP pathway (AKASHI *et al.*, 2009). Thus, the cytoplasmic MVA pathway appears to be out of the synthesis of this important terpenoid precursor in the Rpp background, indicating that repression of the cytoplasmic pathway may be the cause of the reduction in VOC levels in the PI230970 genotype. Although a strong downregulation of the MVA pathway was observed, the induction of isopentenyl diphosphate isomerase, which connects the two pathways involved in IPP production, may be an indicative of IPP supply by plastidial MEP pathway, ensuring the presence of prenyl precursors for terpenoid formation in cytoplasm.

The repression of genes encoding MVA pathway enzymes observed in the W82, Rpp2 and Rpp4 genotypes is consistent with the expression profile observed in the *in silico* analysis, as most of these genes were downregulated in different plant-stress interactions (Table S3). It is possible that the gene

repression observed in these genotypes is a mechanism for the plant to concentrate energy expenditure to ensure glyceollin production, an important phytoalexin in soybean with great influence in host defense reactions. Similar to the observations in this study, the *in silico* analysis found that the enzyme isopentenyl diphosphate isomerase was induced at all timepoints and stresses studied, indicating the importance of this enzyme in plant defense mechanisms and connecting IPP production between the cytoplasm and plastids.

Distinct from other genotypes evaluated in this study, the genotype containing the Rpp5 resistance gene displayed strong induction of the MVA pathway throughout the infection cycle of *P. pachyrhizi*. With the exception of the gene encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, all genes involved in IPP production were strongly upregulated, mainly at the timepoints corresponding to haustorial development (24 and 48 hai). At 48 hai, the expression levels of the genes encoding phosphomevalonate kinase and diphosphomevalonate decarboxylase reached fold-changes of 79.8 and 137 in inoculated samples, respectively, compared to the mock-inoculated samples (Figure 2, Table S2). Interestingly, at this timepoint, a strong repression of isopentenyl-diphosphate isomerase was observed, suggesting a possible accumulation of IPP. At 48 hai, the pathogen was able to establish colonization of plant tissue with haustorium formation and, consequently, direct contact with and effector secretion in the plant cytoplasm. The strong induction of the MVA pathway suggested immediate detection of the fungus by this genotype and the potential importance of terpenoid synthesis in the resistance response mediated by Rpp5.

4.3 The expression profiles of prenylases involved in terpene and glyceollin biosynthesis are dependent on soybean Rpp background genotype

At least one of the three prenylases related to biosynthesis of different terpenoid classes (geranyl diphosphate synthase, geranyl-geranyl diphosphate synthase and (2*E*,6*E*)-farnesyl diphosphate synthase) was induced in soybean after interaction with the fungus *P. pachyrhizi* in the different genotypes analyzed. The enzyme geranyl diphosphate synthase was upregulated in all genotypes assessed at the initial timepoint after infection (12 hai), returning to basal levels until 192 hai, when it was significantly induced again, coinciding with the penetration and sporulation stages of the *P. pachyrhizi* infection cycle. The only genotype in which this biphasic pattern was not observed was in the genotype containing Rpp5 (Figure 2, Table S2).

In the susceptible W82 genotype, all genes encoding prenylases were induced at least at one evaluated timepoint, indicating that mono-, di- and sesquiterpenes may be relevant to the development of basal defense mechanisms of hosts infected with ASR. However, in this genotype, there was no induction of the enzyme α -farnesene synthase (GmTPS); instead, a strong downregulation of this gene was observed (Figure 2, Table S2), suggesting that there is no production of this compound in compatible reactions, corroborating with results of the levels of VOCs in the susceptible Embrapa 48 genotype after rust infection (Table 2).

The enzymes geranyl diphosphate synthase and geranyl-geranyl diphosphate synthase were induced at 12 and 24 hai, respectively, in the

genotype containing the Rpp2 resistance gene. The initial timepoints of fungal development, even after significant repression of MVA pathway genes and, consequently, of the IPP levels suggested that their precursors are potentially derived from the MEP pathway. The considerable repression of (2E, 6E)-farnesyl diphosphate synthase at all timepoints evaluated in this genotype suggests that mono- and diterpenes are being preferentially generated in relation to the development of (*E,E*)- α -farnesene (Figure 2).

In the Rpp4 genotype, the induction of prenylases associated with FPP precursor formation (geranyl diphosphate synthase and (2E, 6E)-farnesyl diphosphate synthase) establishment was observed, followed by upregulation of GmTPS (α -farnesene synthase), indicating the possible production of (*E, E*), α -farnesene, at least during haustorial development and secretion of effector proteins (48 hai). Additionally, significant repression of geranyl-geranyl diphosphate synthase was observed, indicating "capture" of the FPP precursor, favoring production of sesquiterpenes over diterpenes (Figure 2, Table S2). Choi *et. al.* (2008) also observed the induction of α -farnesene synthase in a genotype containing the Rpp1 (PI200492) resistant-gene, after infection with two different isolates (HW94-1 and TW72-1) at the same timepoint of 48 hai (Table S2).

The expression profile observed in the Rpp5 genotype was distinct from all the other profiles. There was a strong induction of genes located at the beginning of the MVA pathway until IPP formation, mainly at timepoints corresponding to appressorium development and intracellular leaf invasion (12 and 24 hai). In contrast, the enzyme isopentenyl diphosphate isomerase was

intensely repressed at intermediate timepoints, coinciding with induction of the enzymes geranyl diphosphate synthase and (2E, 6E)-farnesyl diphosphate synthase, indicating that mono- and diterpene synthesis is preferentially occurring in this genotype.

The enzyme glyceollin synthase, also known as (-)-glycinol 4-dimethylallyltransferase (G4DT), was dramatically induced after fungal inoculation at almost all timepoints and in all genotypes evaluated (Figure 2, Table 2 additional file), independent of which prenylases associated with different classes of terpenes were preferentially induced. Induction of glyceollin production has been reported in soybean in response to infection by *P. pachyrhizi* (CHOI *et al.*, 2008; VAN de MORTEL *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2011), as well as in different interactions studied previously, including *B. japonicum* bacteria (LIBAULT *et al.*, 2010) and oomycetes causing root rot (ZHOU *et al.*, 2009; GIJZEN *et al.*, 2009). These results confirm the importance the glyceollins in the basal defense mechanisms of plants (AKASHI *et al.*, 2009).

Therefore, considering the slight induction of the MVA pathway after infection in the genotypes evaluated, with the exception of the Rpp5 genotype, it is possible to infer an unlikely involvement of the cytoplasmic pathway in generation of precursors for glyceollin biosynthesis. Only the Rpp5 genotype showed a dramatic induction of the MVA pathway, thus being able to generate precursors for glyceollin production by the action of different prenylases, including G4DT. However, it should be noted that, in this genotype, a strong repression of isopentenyl diphosphate isomerase was also observed, indicating

conversion of IPP to DMAPP, and consequently, probable impact of the MVA pathway on the production of the precursor DMAPP. Since high levels of G4DT expression were observed in Rpp5 genotype, it is possible infer that the probable supply of DMAPP to glyceollin production came from the MEP pathway, corroborating the results of AKASHI *et al.* (2009).

4.4 GmTPS, which is involved in the production of the sesquiterpene (*E,E*)- α -farnesene, is generally repressed after *P. pachyrhizi* infection

The expression of VOCs is dependent on the action of different terpene synthases present in the plant, as well as on the concentration of the precursors GPP, FPP and GGPP derived from the MVA and MEP pathways, used as substrates for the production of monoterpenes (10 carbons), sesquiterpenes (15 carbons) and diterpenes (20 carbons). The enzyme GmTPS (*E,E*)- α -farnesene synthase acts in the final step of the production of volatile α -farnesene (a sesquiterpene), converting FPP or GGPP into (*E,E*)- α -farnesene.

The induction of GmTPS was only observed in the Rpp4 background and is coordinated with the activation of the prenylases involved in FPP formation, indicating that the VOC (*E, E*) α -farnesene may be produced at least at the specific time of 48 hai in this genotype. Additionally, the repression of the enzyme E.C. 2.5.1.29 may be a strategy to save the prenyl precursor FPP, repressing diterpene production and contributing to sesquiterpene production.

Adversely, a strong repression of the prenylase (*2E,6E*)-farnesyl diphosphate synthase was verified, followed by repression of GmTPS in the Rpp2 genotype, confirming that in this genotype, the precursors generated were

potentially used in diterpene synthesis, and subsequent (E, E) α -farnesene reduction observed by the VOC levels.

In the susceptible genotype (W82), although FPP had been synthesized, significant GmTPS repression was observed, suggesting that in this genotype, FPP was used as a substrate for mono- and diterpene production. Similar profile was also observed in response to the infection of soybean with the *P. sojae* isolate PT2004C2.S1, whereas at the 24, 48 and 72 hai timepoints, this GmTPS was downregulated (ZHOU *et al.*, 2009).

Based on *in silico* and *in vivo* analyses, it is possible to conclude that there is a variation in the category of VOCs produced by the plant depending on the type of biotic stress. In the case of soybean response to *P. pachyrhizi*, we observed a differential induction of the genes involved in production of terpenes dependent on the Rpp genotype. However, we could not observe a significant difference between susceptible and resistant genotypes studied, indicating that (E,E)- α -farnesene and other terpenes are involved in basal defenses in plants, in general.

4.5 Glyceollin levels are strongly induced by *P. pachyrhizi* infection

Inoculation of soybean leaves with *P. pachyrhizi* fungus resulted in an increase in the peak area for glyceollin in all genotypes tested in comparison to the control (mock-inoculated). Glyceollin induction was detected from 24 hai, culminating with the highest peak area at 192 hai (Figure 3). There was no significant difference between genotypes containing resistance genes and susceptible genotypes; the peak area increase of this phytoalexin was similar in

the W82, Rpp2 and Rpp5 genotypes. These results are in agreement with the observations of Lygin *et al.* (2009), who also studied the same pathosystem interaction and verified accumulation after three weeks of inoculation, especially in the resistant genotypes Rpp1, 2 and 3. The observed glyceollin levels were consistent with the expression of the prenylase glyceollin synthase, which displayed high mRNA transcript levels in all genotypes, as quantified by RT-qPCR.

Glyceollin production in soybean leaves is not a response exclusive to *P. pachyrhizi* infection. Along with G4DT gene induction, there are reports of production of this phytoalexin in other types of interactions of soybean and microorganisms, as the fungi *P. sojae* and *P. citricola* (ZHOU *et al.*, 2009; GIJZEN *et al.*, 2009,), *P. citrcola* and a *B. japonicum* (ZHOU *et al.*, 2009; GIJZEN *et al.*, 2009; SILVA, 2013 and LIBAULT *et al.*, 2010) (Table 3, additional file). Silva (2013) observed that production of glyceollin occurs after *P. sojae* and *P. citricola* induction metabolites contact with soybean cotyledons for 20 hours, suggesting that they represent essential components for innate or basal defense plant responses.

The gene expression analysis results in high expression levels of the gene encoding the enzyme glyceollin synthase (E.C. 2.5.1.36) (Figure 2, Table S2, additional file). Also, those genes associated in the production of DMAPP precursor were detected in inoculated plants at practically all the timepoints and in all genotypes studied from the earliest hours of infection, confirming the high levels of compound detected in all genotypes after infection. However, higher levels of glyceollin were detected only in the later timepoints, suggesting a

possible posttranscriptional control mechanism, such as stability, transport or maturation. However, little is known regarding the posttranscriptional factors, and the relationship between glyceollin synthase gene expression and effective glyceollin production remains elusive.

Based on the observed gene expression of the prenylase glyceollin synthase and the high levels of glyceollin observed in soybean plants after *P. pachyrhizi* infection, it is possible to suggest that this phytoalexin has an important role in the basal resistance response to *P. pachyrhizi* infection in soybean. Even though, when compared to the increase in mRNA levels, protein elevation displays a slower response after detection.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilian Agricultural Research Corporation – EMBRAPA Soybean, who provided all supplies and infrastructure for this work. We also thank the Londrina State University for the opportunity to complete a Master's degree and CAPES for providing grant aids towards the costs.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Author Contributions

FCMG, CBHC, RVA, EON, MB and JP conceived and designed the study; TRP, SLBJ, KC, MA conducted the experiments; TRP, SLBJ, and MA

analyzed the data; TRP and SLBJ wrote the manuscript; all authors read and approved the final version.

8. REFERENCES

AKASHI T, SASAKI K, AOKI T, AYABE S, YAZAKI K (2009) Molecular Cloning and Characterization of a cDNA for Pterocarpan 4-Dimethylallyltransferase Catalyzing the Key Prenylation Step in the Biosynthesis of Glyceollin, a Soybean Phytoalexin. *Plant Physiology*, 149:683–693.

BALDWIN IT, HALITSCHKE R, PASCHOLD A, VON DAHL VA (2006) Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science Signaling*, v. 311, 5762:812-815.

BEDENDO IP (1993) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 3. Ed. São Paulo: Ceres, 1:872-880.

BROMFIELD KR, HARTWIG EE (1980) Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, 20:254–255.

CHAKRABORTY N, CURLEY J, FREDERICK RD, HYTEN DL, NELSON RL, HARTMAN GL, DIERS BW (2009) Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion type resistance to soybean rust. *Crop Science*, v.49, 3:783-790.

CHILDS SP, KING ZR, WALKER DR, HARRIS DK, PEDLEY KF, BUCK JW, LI Z (2018) Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. *Theoretical and applied genetics*, 131:27-41.

CHOI JJ, ALKAROUF NW, SCHNEIDER KT, MATTHEWS BF, FREDERICK RD (2008) Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. *Functional & Integrative Genomics*, 8:341–359.

FARAG MA, HUHMAN DV, DIXON RA, SUMNER LW (2008) Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol* 146: 387–402.

FEHR WR, CAVINESS CE (1981) Stage of soybean development. Iowa State University. Special report 80.

GARCIA A, CALVO ES, SOUZA-KIIHL R, HARADA A, HIROMOTO DM, VIEIRA LG (2008) Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117:545–553.

GIJZEN, DONG S, QUTOB D, TEDMAN-JONES J, KUFLU K (2009) The *Phytophthora sojae* avirulence *locus* Avr3c encodes a multi-copy RXLR effector with sequence polymorphisms among pathogen strains. *PLoS One*, 4:5556.

GOUVEA A, ZANOTTI J, LUCKMANN D, PIZZATTO M, MAZARO SM, POSSENTI JC (2011) Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. *Rev. Bras. de Agroecologia*, v.6, 2:70-78.

HARTWIG EE (1986) Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science*, 26:1135–1136.

HARTWIG EE, BROMFIELD KR (1983) Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, 23:237–239.

HEIL M, SILVA-BUENO JC (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 104, 13:5467-5472.

HUANG M, SANCHEZ-MOREIRAS AM, ABEL C, SOHRABI R, LEE S, GERSHENZON J, THOLL D (2012) The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene ϵ -beta-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*, v. 193, 4:997-1008.

HYTEN DL, HARTMAN GL, NELSON RL, FREDERICK RD, CONCIBIDO VC, NARVEL JM, CREGAN PB (2007) Map location of the *Rpp1* locus that confers Resistance to Soybean Rust in Soybean". *Agronomy & Horticulture - Faculty Publications*. 784. <https://digitalcommons.unl.edu/agronomyfacpub/784>

KIM KS, UNFRIED JR, HYTEN DL, FREDERICK RD, HARTMAN GL, NELSON RL, SONG Q, DIERS BW (2012) Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 125:1339–1352.

LI S, SMITH JR, RAY JD, FREDERICK RD (2012) Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, 125:133–142.

LIBAULT M, FARMER A, BRECHENMACHER L, DRNEVICH J (2010) Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiol*, 152:541-52.

LIU JZ, BRAUN E, QIU W, SHI YF, MARCELINO-GUIMARÃES FC, NAVARRE D, HILL JH, WHITHAM SA (2014) Positive and Negative Roles for Soybean MPK6 in Regulating Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8:824–834.

LYGIN VA, LI S, VITTAL R, WIDHOLM JM, HARTMAN GL, LOZOVAYA VV (2009) The Importance of Phenolic Metabolism to Limit the Growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 99:1412-1420.

MAZARO SM, CITADIN I, GOUVÊA A, LUCKMANN D, GUIMARÃES SS (2008) Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. *Ciência Rural*, Santa Maria, 7:1824-1829.

McLEAN RJ, BYTH D (1980) Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research*, 31:951–956.

MENDGEN K, WIRSEL SG, JUX A, HOFFMANN J, BOLAND W (2006) Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. *Planta*, 6:1353-1361.

MEYER JDF, SILVA DCG, YANG C, PEDLEY KF, ZHANG C, VAN DE MORTEL M, HILL JH, SHOEMAKER RC, ABDELNOOR RV, WHITHAM SA, GRAHAM MA (2009) Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in Soybean. *Plant Physiology*, 150:295–307.

MONTEROS MJ, MISSAOUI AM, PHILLIPS DV, WALKER DR, BOERMA HR (2007) Mapping and Confirmation of the 'Hyyuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. *Crop Science*, Madison, 47:829-834.

MORALES AMAP, O' ROURKE JA, MORTEL MVAN de, SCHEIDER KT, BANCROFT TJ, BORÉM A, NELSON RT, NETTLETON D, BAUM TJ, SHOEMAKER RC, FREDERICK RD, ABDELNOOR RV, PEDLEY KF, WHITHAM SA, GRAHAM MA (2013) Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the Rpp4-mediated Asian soybean rust resistance pathway. *Functional Plant Biology*, 40:1029–1047.

NAOUMKINA M, FARAG MA, SUMNER LW, TANG Y, LIU CJ, DIXON RA (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 17909–17915

NIST N (2005) Mass Spectral Search for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. Office of the Standard Reference Data Base, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland.

PANDEY AK, YANG C, ZHANG C, GRAHAM MA, HORSTMAN HD, LEE Y, ZABOTINA OA, HILL JH, PEDLEY KF, WHITHAM SA (2011) Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24:194–206.

PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:1-10.

PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L (2009) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 30:36.

PICKETT JA, ARADOTTI GI, BIRKETT MA, BRUCE TJA, CHAMBERLAIN K, KHAN ZR, MIDEGA CAO, SMART LE, WOODCOCK CM (2012) Aspects of insect chemical ecology: exploitation of reception and detection as tools for deception of pests and beneficial insects. *Physiological Entomology*, 1:2-9.

SCHNEIDER KT, VAN DE MORTEL M, BANCROFT TJ, BRAUN E, NETTLETON D, NELSON RT, FREDERICK RD, BAUM TJ, GRAHAM MA, WHITHAM SA (2011) Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlates with fungal penetration and haustoria formation. *Plant Physiology*, 157:355–371.

SILVA DC, YAMANAKA N, BROGIN RL, ARIAS CA, NEPOMUCENO AL, DI MAURO AO, PEREIRA SS, NOGUEIRA LM, PASSIANOTTO AL, ABDELNOOR RV (2008) Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 117:57–63.

SILVA PJT (2013) Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por filtrados de *Phytophthora spp.* Trabalho de conclusão de curso apresentado na graduação em tecnologia em biotecnologia, UFPR, Palotina-Pr.

SINCLAIR JB, HARTMAN GL (1999) Soybean rust. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (Eds.). *Compendium of soybean diseases*. St. Paul: APS Press, 25-26.

SKELTON A, CAMERON M, PICKETT J, BIRKETT M (2010) Identification of Neryl Formate as the Airborne Aggregation Pheromone for the American House Dust Mite and the European House Dust Mite (Acari: Epidermoptidae). *Journal of Medical Entomology*, 47: (5) 798-804.

STUDHAM ME and MACINTOSH GC (2013) Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26:116-129.

TAMIRU A, BRUCE TJA, MIDEGA CAO, WOODCOCK CM, BIRKETT MA, PICKETT JA, KHAN ZR (2012) Oviposition induced volatile emissions from African smallholder farmers' maize varieties. *Journal of Chemical Ecology*, 1-4.

TREMBLAY A, HOSSEINI P, ALKHAROUF NW, LI S, MATTHEWS BF (2011) Gene Expression in Leaves of Susceptible *Glycine max* during Infection with *Phakopsora pachyrhizi* Using Next Generation Sequencing. *Sequencing*, 2011:1-14.

TREMBLAY A, HOSSEINI P, ALKHAROUF NW, LI S, MATTHEWSB F (2010) Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Plant Science*, 179:183-193.

TYLER BM (2007) *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular plant pathology*, 8:1-8.

VAN DE MORTEL M, RECKNOR JC, GRAHAM MA, NETTLETON D, DITTMAN JD, NELSON RT, GODOY CV, ABDELNOOR RV, ALMEIDA ÁMR, BAUM TJ, WHITHAM SA (2007) Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. *The American Phytopathological Society*, 20: (8)887–899.

WEBSTER B, BRUCE T, DUFOUR S, BIRKEMEYER C, BIRKETT M, HARDIE J, PICKETT J (2008) Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34: (9) 1153-1161.

YORINORI JT, PAIVA WM, FREDERICK RD, COSTAMILAN LM, BERTAGNOLLI PF, HARTMAN GE, GODOY CV, NUNES-JUNIOR J (2005) Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, 89:675-677.

ZHOU L, MIDEROS SX, BAO L, HANLON R (2009) Infection and genotype remodel the entire soybean transcriptome. *BMC Genomics*. 26:10-49.

SUPPLEMENTARY MATERIAL - The following online material is available for this article:

Table S1 - <Primer design>

Table S2 - <Expression profile of genes of soybean after *P. pachyrhizi* infection by RT>

Table S3 - <Transcriptional characterization genes in response to different soybean diseases>

This material is available as part of the online article from

<http://www.scielo.br/gmb>

FIGURE AND TABLE LEGEND

Table 1 - List of enzymes from the mevalonate pathway identified in KEGG and the corresponding gene models obtained from Phytozome V12.0.

Figure 1 - Fluxogram of mevalonate pathway genes evaluated by RT-qPCR and the different terpenes formed from isopentenyl diphosphate (IPP) through the action of prenylases, as well as terpene synthases (shown in red).

Figure 2 - Expression profiles of the genes involved in terpenoid and glyceollin biosynthesis in soybean after infection with *P. pachyrhizi*. Expression values are presented as the log₂ of the RQ (relative quantification) values determined by the Software REST (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL et al., 2009). These values were converted into a colorimetric scale by the Cluster and Tree View software. Legend: W82 refers to the susceptible cultivar Williams 82, Rpp2 to the resistant PI 230970, Rpp4 to PI459025 and Rpp5 to PI200487. Enzymes: 2.3.1.9, acetyl-CoA acetyltransferase; 2.3.3.10, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; 2.7.1.36, mevalonate kinase; 2.7.4.2-phosphomevalonate kinase; 4.1.1.33, diphosphomevalonate decarboxylase; 5.3.3.2, isopentenyl diphosphate isomerase; 2.5.1.1, geranyl diphosphate synthase; 2.5.1.10, (2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase; 2.5.1.29, geranyl-geranyl diphosphate synthase; 4.2.3.46, α -farnesene synthase (GmTPs); 2.5.1.36, glyceollin synthase. The color scale can be observed below the figure corresponds to the interval between fold-change values.

Figure 3 - Glyceollin concentrations in soybean leaves of different genotypes [Williams 82, PI 230970 (Rpp2), PI 459025 (Rpp4), PI 200487 (Rpp5)] inoculated with *Phakopsora pachyrhizi*, evaluated at six time periods (12, 24, 38, 72, 96, and 192 hai). Data represent the mean of three replicates of representative inoculated samples.

Figure 4 - Chromatographic profiles of volatile solutions obtained from soybean plants, Embrapa 48 (a, c) and PI 230970 (b, d) genotypes. The arrow indicates the volatile compound that had its emission reduced after inoculation with the fungus. (a, b) False-inoculated soybean plants. (c, d) Soybean plants *Phakopsora pachyrhizi* inoculated.

Table 2 - Percentage of infected leaf area in *P. pachyrhizi* inoculated soybean plants and the production of (E, E) alpha-farnesene over 48 hours.